



Facultad de Estudios Superiores  
**IZTACALA**

# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

---



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA  
DE CUERPOS FRUCTÍFEROS  
DE LA CEPA HÍBRIDA PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>**

**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
BIÓLOGA**

**P R E S E N T A  
EVELYN ALEJANDRA BAUTISTA DÍAZ**

**DIRECTORA DE TESIS  
DRA. MARÍA EUGENIA GARÍN AGUILAR**

**Los Reyes Iztacala, Estado de México marzo del 2024**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE** Mtro. David Segura Cobos

**VOCAL** Mtra. Irene Frutis Molina

**SECRETARIO** Dra. María Eugenia Garín Aguilar

**SUPLENTE** Dra. Elizabeth Alejandrina Guzmán Hernández

**SUPLENTE** Dra. Angélica Cruz Solorio

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Farmacobiología (L-514) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, bajo la dirección de la Dra. María Eugenia Garín Aguilar.

El presente estudio contó con el apoyo del Laboratorio de Cultivos Celulares de la Sección de Estudios de Posgrados e Investigación de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI) del Instituto Politécnico Nacional, el cual se encuentra bajo la dirección del Dr. Gustavo Valencia del Toro. De igual manera, se contó con el apoyo del Dr. Ramón Marcos Soto Hernández y del M. en C. Rubén San Miguel Chávez del Laboratorio de Fitoquímica del Programa de Botánica del Colegio de Postgraduados Campus Montecillos, en donde se realizó la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de los extractos hexánico y etanólico de la cepa fúngica híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>.

## AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Mara**, muchas gracias por todo el conocimiento, los consejos, las pláticas y el apoyo que me ha brindado estos años, por ser parte importante de mi formación académica mostrándome otra parte de la biología que no conocía y de la cual estoy fascinada. Gracias por ser mi tutora, estoy completamente segura de que las cosas pasan por algo y el conocerla, me ayudó a crecer como alumna y persona.

A los integrantes de mi jurado de tesis **Dra. Angélica Cruz Solorio, Dra. Elizabeth Guzmán Hernández, Mtro. David Segura Cobos y Mtra. Irene Frutis Molina**, gracias por el tiempo invertido en las observaciones y aportaciones realizadas a mi trabajo ya que con ellas esta investigación fue mucho más completa.

A mis compañeros de laboratorio, **Josué, Itzel y Eréndira**, gracias por todas las risas, las pláticas y las bromas, por estar en todos los buenos y raros momentos, por su apoyo en cada uno de mis experimentos y por hacer que disfrutara mucho estar mucho en el laboratorio. **Josué** muchas gracias por siempre tomarte el tiempo de enseñarme cosas nuevas. Los quiero.

## DEDICATORIAS

**A mi mamá,** gracias porque en todo momento me impulsaste a querer más, por creer en mí y en todo lo que soy capaz de hacer; por todos estos años de desvelarte conmigo platicando en cómo me fue en mi día, qué aprendí y cómo me sentía con la carrera y por siempre estar ahí para apoyarme en cada paso que doy. Es y siempre será un privilegio ser tu hija, te amo.

**A mi hermana,** Angie siempre serás mi niña pequeña, gracias por ser mi confidente, por estar cuando te necesito, por echarme porras en todo momento y por las pláticas que aunque no te agraden mucho ciertas cosas de mi carrera, siempre me das tu consejo.

**A mi papá enano, mamá tina y tía Juana,** que en todo momento me dieron ánimos cuando ya estaba cansada, por creer en mí y por siempre mostrarme su apoyo. Es un verdadero honor ser parte de esta bonita familia. Los amo.

**A Javier,** que has sido parte de mi vida estos últimos ocho años, gracias por tu amistad, por tus consejos y por tu incondicional apoyo. Estoy agradecida con la vida por haberte conocido y que seas parte de la familia que he escogido, te quiero mucho.

Sin ustedes en mi vida, nada sería igual, los amo mucho.

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| <b>RESUMEN</b>  | 1  |
| <b>I INTRODUCCIÓN</b>   | 2  |
| <b>II MARCO TEÓRICO</b>   |    |
| II.1 Inflamación  | 5  |
| II.1.1 Etapas del proceso inflamatorio  | 5  |
| II.1.2 Clasificación de la inflamación  | 6  |
| II.1.3 Mecanismo fisiológico de la inflamación                                    | 7  |
| II.1.4 Mediadores de la inflamación   | 9  |
| II.1.4.1 Mediadores derivados del plasma  | 9  |
| II.1.4.2 Mediadores celulares   | 9  |
| II.1.4.3 Otros mediadores. <i>Radicales libres</i>                                | 12 |
| II.2 Fármacos antiinflamatorios. Mecanismo de acción                              |    |
| II.2.1 Fármacos antiinflamatorios esteroideos                                     | 13 |
| II.2.2 Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE's)                         | 13 |
| II.2.3 Ventajas del uso de fármacos antiinflamatorios                             | 13 |
| II.2.4 Efectos adversos de los fármacos antiinflamatorios                         | 14 |
| II.3 Búsqueda de nuevos fármacos antiinflamatorios                                | 15 |
| II.3.1 <i>Pleurotus djamor</i>  | 15 |
| II.3.2 <i>Lentinula edodes</i>  | 16 |
| II.4 Hibridación  | 17 |
| II.4.1 Obtención de cepas híbridas  | 17 |
| II.4.1.1 Desdicarriotización química  | 18 |
| <b>III ANTECEDENTES</b>   |    |
| III.1 Los hongos como alternativa de fármacos antiinflamatorios                   | 20 |
| III.2 <i>Pleurotus djamor</i> y <i>Lentinula edodes</i> . Estudios experimentales | 21 |
| III.2.1 Relación entre la capacidad antioxidante y antiinflamatoria               | 22 |
| III.3 Hibridación. Evaluación de aspectos comerciales                             | 23 |
| III.4 Actividad biológica de cepas híbridas                                       | 24 |
| <b>IV JUSTIFICACIÓN</b>   | 25 |

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| <b>V</b>    | <b>HIPÓTESIS</b>   | 25 |
| <b>VI</b>   | <b>OBJETIVOS</b>   |    |
| VI.1        | Objetivo general   | 26 |
| VI.2        | Objetivos específicos  | 26 |
| <b>VII</b>  | <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>                                  |    |
| VII.1       | Cepa fúngica   | 27 |
| VII.2       | Animales   | 27 |
| VII.3       | Obtención de extractos                                       | 27 |
| VII.4       | Preparación de los fármacos y del extracto                   | 27 |
| VII.5       | Actividad antiinflamatoria. Edema auricular inducido por TPA | 28 |
| VII.6       | Análisis químico   | 30 |
|             | VII.6.1 Análisis preliminar fitoquímico                      | 30 |
|             | VII.6.2 HPLC. Cromatografía líquida de alta resolución       | 32 |
| VII.7       | Análisis estadístico   | 33 |
| <b>VIII</b> | <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>                                |    |
| VIII.1      | Actividad antiinflamatoria. Edema auricular inducido por TPA | 34 |
| VIII.2      | Análisis químico   | 36 |
|             | VIII.2.1 Análisis preliminar fitoquímico                     | 36 |
|             | VIII.2.2 HPLC. Cromatografía líquida de alta resolución      | 38 |
|             | VIII.2.2.1 Ácidos fenólicos                                  | 38 |
|             | VIII.2.2.2 Flavonoides                                       | 43 |
|             | VIII.2.2.3 Terpenoides                                       | 48 |
| <b>IX</b>   | <b>CONCLUSIONES</b>  | 56 |
| <b>X</b>    | <b>LITERATURA CITADA</b>                                     | 57 |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Figura 1</b>  | Etapas del proceso inflamatorio  | 6  |
| <b>Figura 2</b>  | Mecanismo fisiológico de la inflamación  | 8  |
| <b>Figura 3</b>  | Metabolitos del ácido araquidónico y sus principales funciones en el proceso inflamatorio  | 11 |
| <b>Figura 4</b>  | Fases de la reacción en cadena   | 12 |
| <b>Figura 5</b>  | Cascada del ácido araquidónico, sitios en donde actúan los fármacos antiinflamatorios  | 13 |
| <b>Figura 6</b>  | Morfología de <i>Pleurotus djamor</i>  | 15 |
| <b>Figura 7</b>  | Morfología de <i>Lentinula edodes</i>  | 16 |
| <b>Figura 8</b>  | Obtención de cepas híbridas mediante desdicariorización química  | 18 |
| <b>Figura 9</b>  | Fructificaciones de las cepas parentales   | 19 |
| <b>Figura 10</b> | Diagrama del procedimiento para evaluar la actividad antiinflamatoria siguiendo el modelo de edema auricular inducido con TPA                          | 29 |
| <b>Figura 11</b> | Media $\pm$ ESM del porcentaje de inflamación 4 h después de la aplicación del Exto Hx y Exto EtOH de la cepa PD <sub>4</sub> x LC <sub>3</sub> (n=7). | 35 |
| <b>Figura 12</b> | Cromatograma HPLC-Ácidos Fenólicos en el Exto Hx de la cepa fúngica híbrida PD <sub>4</sub> x LC <sub>3</sub> .  | 41 |
| <b>Figura 13</b> | Cromatograma HPLC-Ácidos Fenólicos en el Exto EtOH de la cepa fúngica híbrida PD <sub>4</sub> x LC <sub>3</sub>  | 42 |
| <b>Figura 14</b> | Cromatograma HPLC-Flavonoides en el Exto Hx de la cepa fúngica híbrida PD <sub>4</sub> x LC <sub>3</sub>   | 46 |
| <b>Figura 15</b> | Cromatograma HPLC-Flavonoides en el Exto EtOH de la cepa fúngica híbrida PD <sub>4</sub> x LC <sub>3</sub>   | 47 |
| <b>Figura 16</b> | Cromatograma HPLC-Terpenoides en el Exto Hx de la cepa fúngica híbrida PD <sub>4</sub> x LC <sub>3</sub>   | 52 |
| <b>Figura 17</b> | Cromatograma HPLC-Terpenoides en el Exto EtOH de la cepa fúngica híbrida PD <sub>4</sub> x LC <sub>3</sub>   | 53 |

## ÍNDICE DE CUADROS

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Cuadro 1.</b> | Principales características de la inflamación aguda y crónica  | 7  |
| <b>Cuadro 2.</b> | Actividad antiinflamatoria del Exto Hx y Exto EtOH de la cepa fúngica híbrida PD <sub>4</sub> x LC <sub>3</sub> en el modelo de edema auricular inducido por TPA | 36 |
| <b>Cuadro 3.</b> | Análisis preliminar fitoquímico realizado al Exto EtOH de la cepa fúngica híbrida PD <sub>4</sub> x LC <sub>3</sub>  | 37 |

## ABREVIATURAS

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>5-LOX</b>                   | 5-lipooxigenasa                                  |
| <b>AA</b>                      | Ácido araquidónico                               |
| <b>AINE's</b>                  | Antiinflamatorios no esteroideos                 |
| <b>C48/80</b>                  | Compuesto C48/80                                 |
| <b>COX</b>                     | Ciclooxigenasa                                   |
| <b>COX-1</b>                   | Ciclooxigenasa 1                                 |
| <b>COX-2</b>                   | Ciclooxigenasa 2 (inducible)                     |
| <b>DMPD</b>                    | Dihidrocloreuro de N, N-dimetil-p-fenilendiamina |
| <b>DSS</b>                     | Dioctilsulfosuccinato de sodio                   |
| <b>fMLP/CB</b>                 | fornil-metionil-leucil-fenilalanina              |
| <b>GC</b>                      | Glucocorticoides                                 |
| <b>HPLC</b>                    | Cromatografía líquida de alta resolución         |
| <b>IFN</b>                     | Interferón                                       |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | Interferón gamma                                 |
| <b>IL-1</b>                    | Interleucina 1                                   |
| <b>IL-1<math>\alpha</math></b> | Interleucina 1 alfa                              |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>  | Interleucina 1 beta                              |
| <b>IL-2</b>                    | Interleucina 2                                   |
| <b>IL-3</b>                    | Interleucina 3                                   |
| <b>IL-4</b>                    | Interleucina 4                                   |
| <b>IL-6</b>                    | Interleucina 6                                   |
| <b>IL-8</b>                    | Interleucina 8                                   |

Actividad antiinflamatoria de cuerpos fructíferos de la cepa híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>IL-10</b>            | Interleucina 10   |
| <b>IL-12</b>            | Interleucina 12   |
| <b>IL-17</b>            | Interleucina 17   |
| <b>IL-18</b>            | Interleucina 18   |
| <b>iNOS</b>             | Óxido nítrico sintasa inducible                           |
| <b>IP-10</b>            | Proteína inducible por interferón gamma de 10 kDa         |
| <b>LPS</b>              | Lipopolisacáridos   |
| <b>MAPK</b>             | Proteína quinasa activada por mitógenos                   |
| <b>MCP-1</b>            | Proteína quimiotáctica de monocitos 1                     |
| <b>MCP-3</b>            | Proteína quimiotáctica de monocitos 3                     |
| <b>NF-κB</b>            | Factor nuclear kappa por linfocitos B                     |
| <b>NO</b>               | Óxido nítrico   |
| <b>p38 MAPK</b>         | Proteína quinasa p38 activadas por mitógenos              |
| <b>PGD<sub>2</sub></b>  | Prostaglandina D <sub>2</sub>                             |
| <b>PGE<sub>2</sub></b>  | Prostaglandina E <sub>2</sub>                             |
| <b>PGI<sub>2</sub></b>  | Prostaglandina I <sub>2</sub>                             |
| <b>PMN</b>              | Leucocitos polimorfonucleares                             |
| <b>PTGS<sub>2</sub></b> | Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2                     |
| <b>STAT</b>             | Trasductores de señales y activadores de la transcripción |
| <b>TGF-β</b>            | Factor de crecimiento transformador-beta                  |
| <b>TNF-α</b>            | Factor de necrosis tumoral alfa                           |
| <b>TPA</b>              | 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato                       |
| <b>VEGF</b>             | Factor de crecimiento endotelial vascular                 |

## RESUMEN

*Pleurotus djamor* y *Lentinula edodes* son hongos catalogados como funcionales por las propiedades nutricionales y medicinales que presentan. A través del proceso de hibridación entre éstas, se han obtenido nuevas cepas (híbridos intergénero) que han mejorado sus aspectos comerciales (desarrollo micelial, velocidad de crecimiento, eficiencia biológica, rendimiento). Si bien hay reportes de la mejora de los parámetros para su cultivo a nivel comercial, existen pocos estudios sobre el mejoramiento de las actividades terapéuticas de extractos o compuestos aislados de las cepas híbridas. En el presente estudio se evaluó *in vivo* la actividad antiinflamatoria de los extractos hexánico (Exto Hx) y etanólico (Exto EtOH) de la harina de cuerpos fructíferos de la cepa híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub> que se obtuvo por desdicariorización de las cepas parentales *Pleurotus djamor* y *Lentinula edodes*. La actividad antiinflamatoria de los extractos se cuantificó, empleando el modelo de edema auricular inducido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) en ratón macho Hsd:ICR (CD-1®). Por HPLC se determinaron y cuantificaron los ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides presentes en los extractos. Las dosis de 125 y 250 µg/10µL de ambos extractos de la cepa fúngica híbrida disminuyeron el edema inducido por el agente irritante TPA, alcanzándose una reducción del 76.50% con 125 µg/10µL de Exto Hx. El análisis por HPLC identificó la presencia de algunos ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides a los que en la literatura se les ha atribuido actividad biológica, destacando la antiinflamatoria. Este es el primer reporte sobre la actividad antiinflamatoria *in vivo* de la cepa fúngica híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>; actividad que puede atribuirse a la sinergia de los compuestos fenólicos y terpenoides presentes en el extracto.

## I. INTRODUCCIÓN

La inflamación es una respuesta fisiológica innata a lesiones tisulares o estímulos nocivos tales como los patógenos, infecciones, la irradiación de luz UV, entre otros (Elsayed *et al.*, 2014; Joseph, Edirisinghe & Burton-Freeman, 2016), se caracteriza por la presencia de síntomas físicos como fiebre, dolor o hinchazón, ocasionados por cambios en la vasodilatación o aumento en la permeabilidad (Bellik *et al.*, 2012; Murphy, 2012). De manera general, el proceso inflamatorio se puede dividir en cuatro etapas: iniciación, ampliación, destrucción y finalización (Murphy, 2012).

La inflamación se clasifica en dos tipos, aguda y crónica. La primera se caracteriza por la exudación de proteínas plasmáticas y acumulación de leucocitos, mientras que la crónica, presenta infiltración de células monocelulares, destrucción tisular y lesión hística provocada por la prolongación de la respuesta inflamatoria (Mitchell, 2013; Murphy, 2012).

Existen evidencias que relacionan la inflamación con el estrés oxidativo, esto por el papel que juegan los radicales libres en diversos procesos biológicos. Mediadores inflamatorios liberados por monocitos activados y leucocitos polimorfonucleares (PMN), así como la activación del ácido araquidónico son fuentes endógenas de radicales libres durante el proceso inflamatorio (de la Peña & Redondo, 1997; Mariaca, Zapata & Uribe, 2016).

Los fármacos antiinflamatorios buscan inhibir los efectos provocados por la inflamación (Divins, 2014), estos se clasifican en fármacos antiinflamatorios esteroideos (glucocorticoides) y no esteroideos (AINE's). Además de las propiedades antiinflamatorias, que muestran los fármacos antiinflamatorios, se ha señalado que los AINE's contribuyen en la reducción de eventos relacionados con enfermedades coronarias (de Gaetano & Collaborative Group of the Primary Prevention Project, 2001), mientras que los glucocorticoides forman parte del tratamiento inmunosupresor para evitar el rechazo en trasplante de órganos (Plaza-Pérez, 1983). No obstante, este tipo de fármacos van a presentar múltiples efectos adversos, entre los que se encuentran la retención de líquidos, osteoporosis, afecciones gastroduodenales, entre otros (Sebastián-Domingo, 2002; Gutiérrez-Restrepo, 2021).

Por lo cual, diferentes grupos de investigación han centrado sus esfuerzos en la búsqueda de nuevos compuestos con potencial antiinflamatorio y con la posibilidad de menos efectos adversos, aislando sustancias contenidas en plantas y hongos que de manera empírica diferentes comunidades les atribuyen propiedades antiinflamatorias. En nuestro país se producen hongos catalogados como alimentos funcionales por las propiedades nutricionales y efectos medicinales que presentan, como los géneros *Pleurotus* y *Lentinula* (Juárez-Pacheco, 2013; Rivera, Albarracín & Lares, 2017).

Se ha reportado que *Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn, contiene altos niveles de carbohidratos (32.7 - 48.3 g), de proteína cruda (20.7- 28 g) y baja cantidad de grasas (0.11 - 2.09 g) (Salmones, 2017). La medicina tradicional oriental ha atribuido a este hongo propiedades como la relajación de músculos, tendones y articulaciones (Hifas da terra, b). Lo anterior, ha derivado en investigaciones experimentales enfocadas al estudio de sus propiedades biológicas, como lo la antibacteriana (Das *et al.*, 2017), antifúngica (Acharya & Saha, 2011) y antioxidante (Guzmán, 2009), entre otras.

Por otro lado, se ha señalado que entre las propiedades nutricionales reportadas para *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, se encuentran la cantidad de proteína en hongo entero (22.8 g) (Bisen *et al.*, 2010), sus bajos niveles de grasas (0.49 g por 100 g de hongo) y su alto contenido de vitaminas y minerales, entre los que se encuentran la tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), y vitamina D (CONICET, 2009; USDA, 2019). Dentro de la medicina tradicional oriental, es considerado un alimento que potencializa el Jing-Qi, es decir la energía vital, así como el sistema Xie-Qi (resistencia a patógenos) (Hifas da Terra, a). Entre las propiedades biológicas reportadas de *L. edodes* destacan su capacidad antioxidante (Khaund & Joshi, 2016) y su efecto antiinflamatorio (Campuzano & Carpio, 2020).

A nivel mundial, tanto el género *Pleurotus* como *L. edodes*, son dos de los tres hongos con mayor producción (27% y 17% respectivamente), tan solo después del género *Agaricus* (30%) (Royse, 2014). En México la producción anual del género *Pleurotus* en el año 2005 fue de 2190 toneladas, lo que representa aproximadamente el 4.62% de la producción comercial (Martínez-Carrera *et al.*, 2006; Mora & Martínez-Carrera, 2007),

mientras que la producción de *L. edodes* en el 2002 fue de 3.45%, donde México fue el segundo productor solo después de Brasil (Gutiérrez-Saldaña, 2005).

El sector comercial ha buscado mejorar, a través de la hibridación, algunos parámetros de productividad como incrementar la eficiencia biológica o bien disminuir los tiempos de cultivo de los hongos. La hibridación es un mecanismo por el cual, características genéticas deseables presentes en cepas parentales se combinan con el fin de obtener cepas híbridas (Sonnenberg *et al.*, 2005). Uno de los mecanismos para la obtención de cepas híbridas es la desdicariorización. Durante este proceso, se separan de manera artificial, los dos componentes (monocariotes o neohaplontes) que constituyen la célula fúngica parental. Posteriormente, se aparean los neohaplontes resultantes de dos cepas parentales diferentes para así obtener una cepa híbrida (intergénero o interespecie).

Si bien hay evidencia sobre la mejora que las cepas híbridas presentan sobre algunos sus atributos o propiedades de interés comercial (Ramírez-Carrillo, 2011; Valenzuela-Cobos, 2018), hasta el momento de la revisión, pocos son los estudios que han evaluado las propiedades biológicas de las cepas híbridas. Entre estos trabajos destacan el estudio de la actividad antibacteriana de cepas parentales e híbridas del género *Pleurotus* (Valencia del Toro *et al.*, 2012) y la determinación de la capacidad antioxidante de cepas silvestres de *P. djamor* var. *roseus* y *P. djamor* var. *djamor*, así como sus cuatro híbridas y dos cepas reconstituidas (Oropeza-Guerrero, 2017).

Con base en lo anterior, y con la finalidad de profundizar en el estudio de la actividad biológica de cepas híbridas, el objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antiinflamatoria de los extractos hexánico y etanólico de la cepa híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>, en un modelo murino de inflamación aguda.



## II. MARCO TEÓRICO

### II.1. Inflamación

La inflamación es la respuesta fisiológica innata a lesiones tisulares o estímulos nocivos de origen biológico, químico o físico. Dentro de los estímulos de origen biológico se encuentran las bacterias, hongos y patógenos. Productos industriales o alimenticios, así como los medicamentos son ejemplos de estímulos nocivos de origen químico. Por último, los estímulos físicos abarcan procesos como las cirugías, traumatismos o la irradiación de luz UV (Elsayed *et al.*, 2014; Joseph, Edirisinghe & Burton-Freeman, 2016; Vega-Robledo, 2008).

La función principal de la inflamación es eliminar los agentes lesivos y los componentes histiósicos dañados. Dicho proceso se caracteriza por la presencia de síntomas físicos como rubor, fiebre, dolor e hinchazón, ocasionados por cambios en la vasodilatación o aumento en la permeabilidad capilar (Bellik *et al.*, 2012; Murphy, 2012).

#### II.1.1. Etapas del proceso inflamatorio

A continuación, se describen las cuatro etapas del proceso inflamatorio señaladas en Murphy (2012): iniciación, ampliación, destrucción y finalización (Figura 1).

En la **iniciación**, se activan mediadores solubles y células inflamatorias que se dirigen al área de la lesión, también se liberan moléculas que van a alterar la permeabilidad.

La **ampliación**, dependerá de la extensión de la lesión y activación de citocinas, adicionalmente se reclutarán leucocitos y macrófagos.

En la etapa de **destrucción**, se eliminan los materiales extraños con la finalidad de controlar la respuesta inflamatoria, esto ocurre mediante procesos como la fagocitosis o la digestión enzimática.

Por último, en la etapa de **finalización** los mecanismos antiinflamatorios van a limitar el daño histiósico y permitir la recuperación.

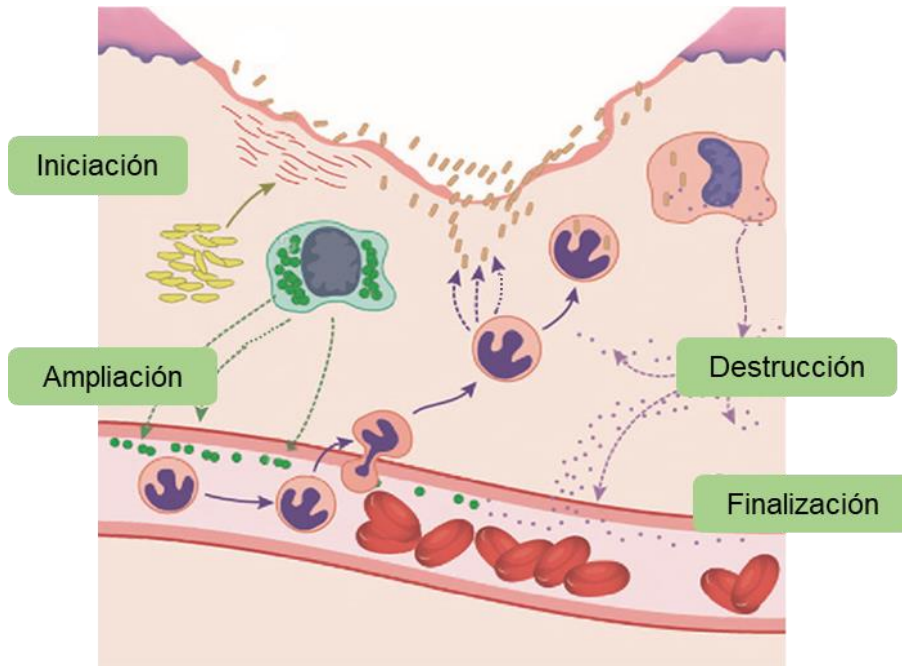


Figura 1. Etapas del proceso inflamatorio. Modificado de AlphaChem, 2022.

### II.1.2. Clasificación de la inflamación

La inflamación se puede clasificar en dos tipos, aguda y crónica (Cuadro 1). La inflamación aguda se caracteriza por la exudación de proteínas plasmáticas y acumulación de leucocitos polimorfonucleares (PMN). Este tipo de inflamación presenta dos componentes principales, los cambios vasculares (vasodilatación y aumento en la permeabilidad vascular) y acontecimientos celulares como el reclutamiento de leucocitos. Por otro parte, la inflamación crónica, presentar infiltración de células monocelulares, destrucción tisular y lesión hística provocado por la prolongación de la respuesta inflamatoria (Mitchell, 2013; Murphy, 2012).

**Cuadro 1.** Principales características de la inflamación aguda y crónica. Mitchell, 2013.

|                           | <b>Aguda</b>   | <b>Crónica</b>   |
|---------------------------|--|--|
| <b>Duración</b>           | Minutos a horas  | Días   |
| <b>Infiltrado celular</b> | Neutrófilos  | Macrófagos y linfocitos  |
| <b>Lesión tisular</b>     | Autolimitada   | Progresiva   |
| <b>Estímulos</b>          | Infecciones, traumatismos, necrosis tisular, reacciones inmunitarias | Infecciones persistentes, enfermedades por hipersensibilidad, exposición prolongada a agentes con potencial toxico |

### II.1.3. Mecanismo fisiológico de la inflamación

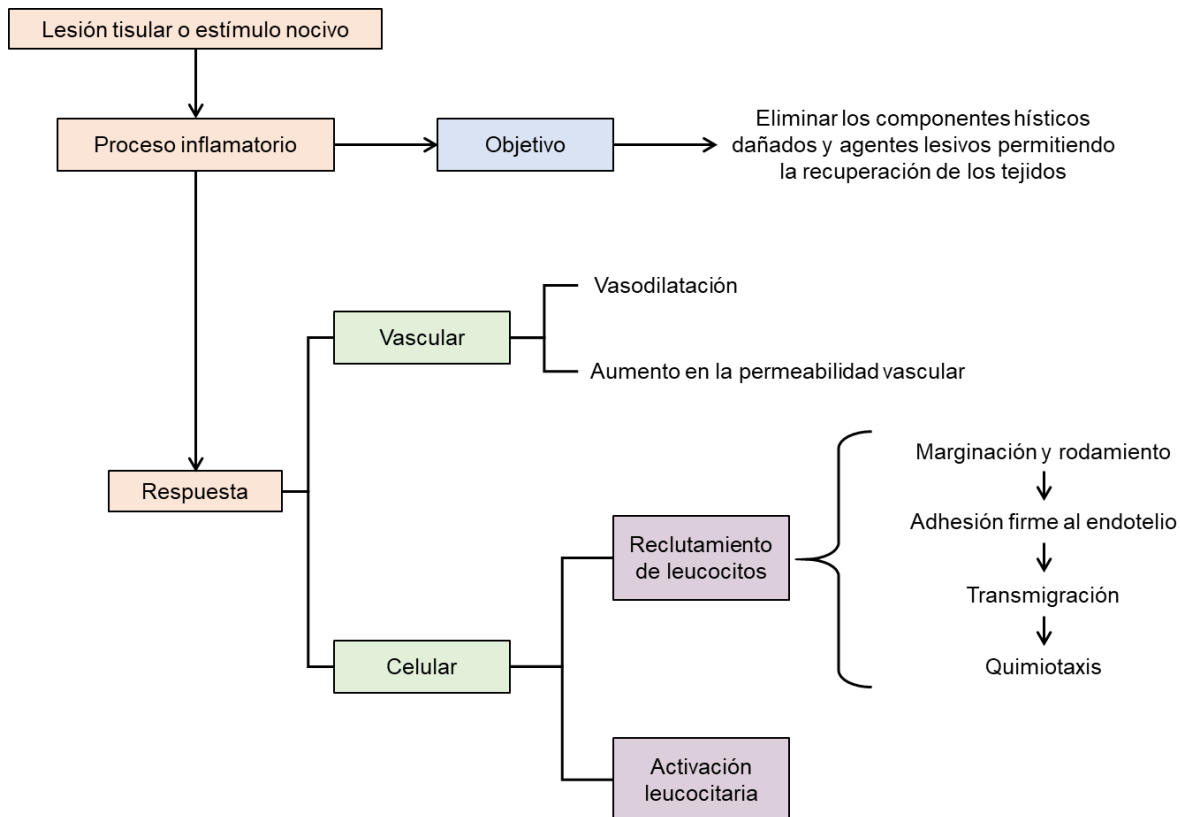
Ante lesiones o estímulos nocivos implicados en el proceso inflamatorio agudo, en nuestro organismo se desencadenan respuestas a nivel vascular y celular (Figura 2).

La respuesta a **nivel vascular** se caracteriza por un aumento tanto en el flujo sanguíneo como en la permeabilidad vascular. Esta fase comienza con vasoconstricción temporal (estrechamiento de vasos sanguíneos), posteriormente por acción de mediadores como el óxido nítrico y la histamina, se produce vasodilatación arteriolar, la cual permite el aumento en el flujo de sangre y que el lecho capilar se extienda. El aumento de la permeabilidad vascular ocasiona un desplazamiento de líquido rico en proteínas, la acumulación de este líquido provoca el edema, de igual manera este proceso permite que las proteínas plasmáticas y leucocitos accedan a los focos de infección (Mitchell, 2013).

La **fase celular** comienza con el reclutamiento de leucocitos (PMN), inicia con la *marginación y rodamiento*, donde células como eritrocitos y leucocitos son arrastrados por el flujo laminar contra la pared celular; al tener un mayor tamaño los leucocitos se acumulan en la periferia e interactúan con las células endoteliales (marginación), en caso de ser activadas las células endoteliales (por acción de citocinas u otros mediadores), se van a expresar moléculas de adhesión, las cuales se unen y separan, lo que ocasiona su

rodamiento en la superficie endotelial. Posteriormente se desarrolla el siguiente paso, la *adhesión firme al endotelio*, en donde las integrinas interactúan con los ligandos de células endoteliales, dando lugar a la separación de células endoteliales, la extensión de sus pseudópodos y que éstas *transmigren* por la pared vascular. Esta migración es medida por quimiocinas (citocinas quimiotácticas secretadas por moléculas en los focos de inflamación), permitiendo el desplazamiento de leucocitos hacia los lugares de la lesión, proceso conocido como *quimiotaxis* (Merkle, 2011; Mitchell, 2013).

Una vez reclutados hacia el foco de infección, los leucocitos deben ser activados con la finalidad de desarrollar funciones como la fagocitosis, la destrucción y degradación de partículas previamente fagocitadas, la secreción de sustancias microbicidas y la producción de mediadores como los metabolitos del ácido araquidónico y citocinas (Mitchell, 2013).



**Figura 2.** Mecanismo fisiológico de la inflamación. Modificado de Merkle, 2011; Mitchell, 2013.

## **II.1.4 Mediadores inflamatorios**

Los mediadores son sustancias químicas inducidas ante la presencia de estímulos inflamatorios. Se dividen de acuerdo con el lugar en donde se originan. Los *mediadores derivados del plasma* actúan como precursores inactivos y son sintetizados en el hígado, mientras que los *mediadores celulares* se producen por células en el foco de la infección (Merkle, 2011; Ruibal-León *et al.*, 2004).

### **II.1.4.1 Mediadores derivados del plasma**

#### ***Sistema de complemento***

Este sistema genera compuestos (C1-C9) que al activarse (mediante proteólisis) contribuyen en la respuesta inflamatoria, C3a y C5a aumentan la permeabilidad vascular e inducen la vasodilatación y C5a activa la vía de la lipooxigenasa, además de ser un factor quimiotáctico de neutrófilos, monocitos y basófilos (Murphy, 2012; Echeverry, 1992).

#### ***Sistema de cininas***

Las cininas son péptidos vasoactivos derivados de proteínas plasmáticas específicas conocidas como cininógenos (Toledo, 2014). La activación de este sistema finaliza con la producción de bradicinina, la cual provoca aumento en la permeabilidad vascular y dilatación arteriolar (Murphy, 2012).

#### ***Sistema de coagulación***

Entre las funciones del sistema de coagulación se encuentran inducir la actividad de la trombina y la formación de fibrina (Toledo, 2014). La trombina contribuye en la inflamación al unirse a receptores activados por proteasas, esta unión fomenta la adhesión de leucocitos (Mitchell, 2013).

### **II.1.4.2 Mediadores celulares**

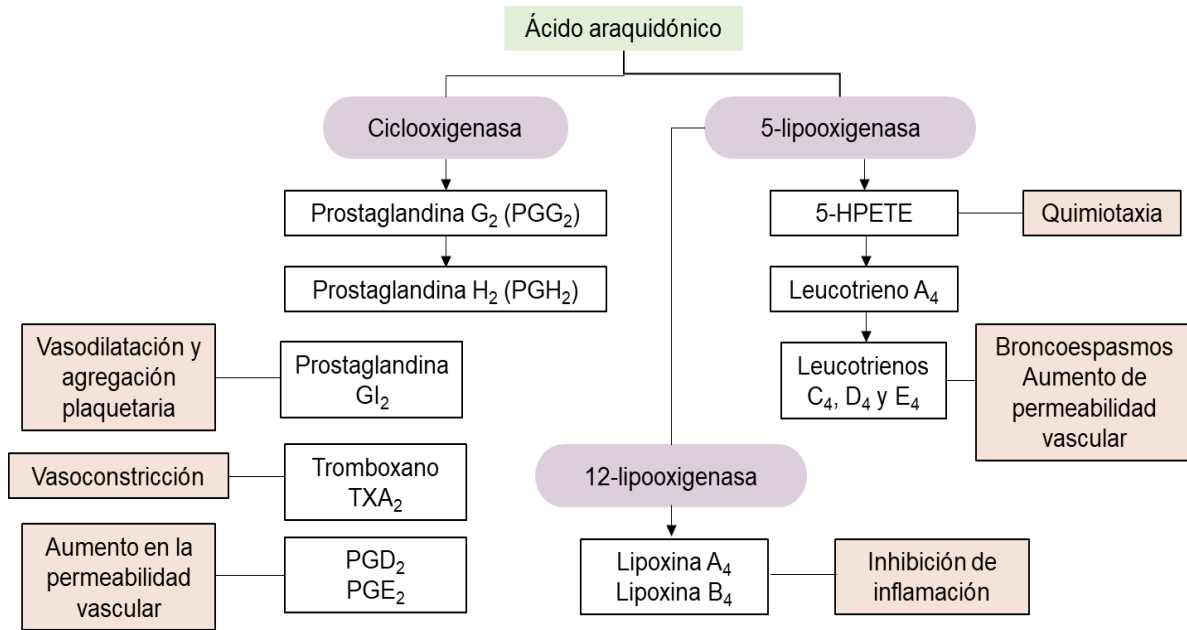
#### ***Aminas vasoactivas***

Durante el proceso inflamatorio, entre los primeros mediadores inflamatorios liberados son la histamina y serotonina, aminas vasoactivas que se almacenan como moléculas preformadas en los mastocitos. La **histamina** induce la contracción del endotelio venular

ocasionando dilatación de las arteriolas y un aumento en la permeabilidad vascular (Merkle, 2011). Por otro lado, la **serotonina** va a inducir la vasoconstricción en la coagulación (Mitchell, 2013).

### ***Metabolitos del ácido araquidónico (AA)***

El ácido araquidónico es un ácido graso tetrainsaturado sintetizado a partir del ácido linoleico. Los metabolitos de este compuesto se van a denominar eicosanoides (20 carbonos), entre los cuales se encuentran las prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y lipoxinas (Figura 3) (Cantú *et al.*, 2017). Entre las **prostaglandinas** involucradas en el proceso inflamatorio se encuentran PGE<sub>2</sub> la cual produce vasodilatación, inhibe la agregación plaquetaria y puede desencadenar fiebre e hipersensibilidad al dolor; PGD<sub>2</sub> la cual potencializa la formación del edema (Hwang *et al.*, 2013; Mitchell, 2013). El **tromboxano A<sub>2</sub>** participan en la agregación plaquetaria, regulando la coagulación sanguínea, de igual manera está involucrado en procesos de adhesión (Cantú *et al.*, 2017). Los **leucotrienos (LTs)** son producidos a partir de la 5-lipooxigenasa, éstos afectan en la extravasación y quimiotaxis de neutrófilos, eosinófilos y monocitos (LTB<sub>4</sub>) además de causar broncoconstricción (estrechamiento de las vías aéreas) y un aumento en la permeabilidad vascular. Por último, las **lipoxinas** son mediadores antiinflamatorios que van a inhibir la quimiotaxis en neutrófilos y su adhesión al endotelio (Merkle, 2011).



**Figura 3.** Metabolitos del ácido araquidónico y sus principales funciones en el proceso inflamatorio. Modificado de Mitchell, 2013.

### **Citocinas**

Las citocinas son mediadores proteicos producidos por diferentes tipos celulares que actúan como reguladores de la respuesta inflamatoria. De manera general las citocinas van a activar el endotelio vascular lo cual induce la síntesis de moléculas de adhesión, factores de crecimiento, y otras citocinas (Claramunt, 2011). Entre las principales *citocinas proinflamatorias* se encuentran el factor de necrosis tumoral alfa (**TNF- $\alpha$** ), el cual induce el crecimiento y la agregación de neutrófilos y la interleucina 1 (**IL-1**) que va a activar los fibroblastos tisulares (Merkle, 2011). Algunas citocinas como el factor de crecimiento transformador-beta (**TGF- $\beta$** ) y las interleucinas 3, 4 y 10 (**IL-3**, **IL-4** e **IL-10**) actúan como inhibidoras en el proceso inflamatorio. **TGF- $\beta$**  reduce la producción de **IL-2**, **TNF- $\alpha$**  e **IFN- $\gamma$**  (Letterio & Roberts, 1997). Por otro lado, **IL-10** inhibe citocinas como **TNF**, **IL-1** e **IL-6** lo cual estimula la producción endógena de citocinas antiinflamatorias (Barros de Oliveira *et al.*, 2011).

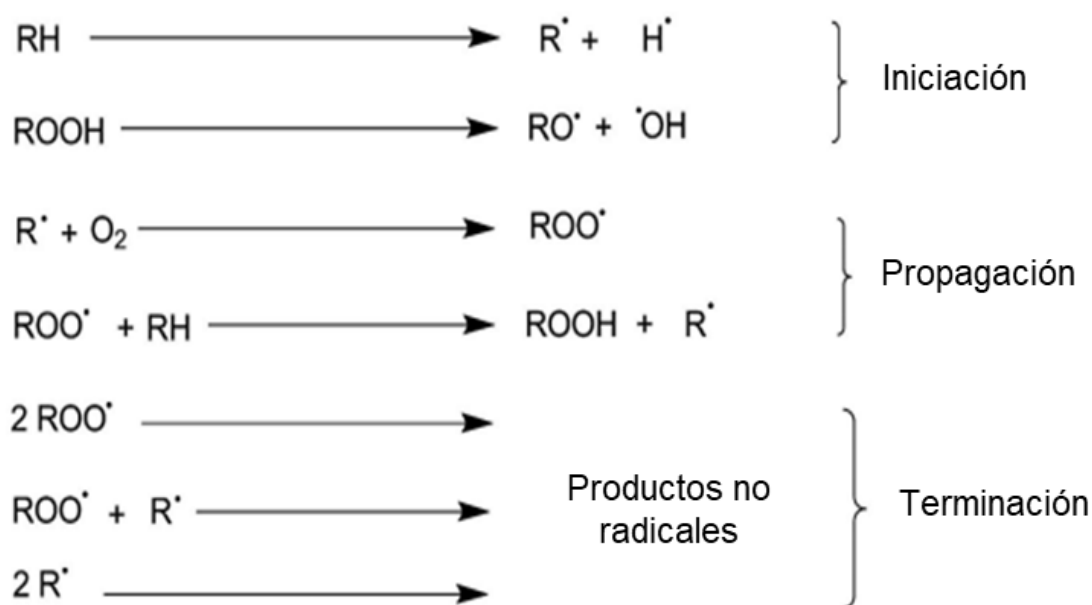
### **Quimiocinas**

Son mediadores secretados por células endoteliales activadas y por otros tipos celulares en respuesta al daño tisular o estímulos como los lipopolisacáridos (LPS) o citocinas

proinflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$ . Las quimiocinas son encargadas de direccionar el movimiento de los leucocitos circulares hacia el sitio de la inflamación (Lezama, 2006).

### II.1.4.3 Otros mediadores. *Radicales libres*

Un radical libre se define como un átomo, molécula o sustancia con uno o más electrones desapareados en su último orbital (Corrales & Araiza, 2012). Los radicales se generan a partir de una reacción en cadena (Figura 4), que consta de tres fases, la primera es la iniciación, donde un radical logra obtener el electrón faltante, provocando que la molécula que donó su electrón se convierta en un radical libre. Durante la fase de propagación, el proceso se va a repetir con cada radical que obtiene su electrón, por último, en la de finalización se forman especies neutras o productos no radicales (Avello & Suwalski, 2006).



**Figura 4.** Fases de la reacción en cadena. Modificado de Zeb, 2020.

Durante la respuesta inflamatoria se van a liberar radicales libres que van a actuar como mediadores de la inflamación. El óxido nítrico es un radical libre que en concentraciones bajas favorece la vasodilatación y el reclutamiento de leucocitos, mientras que en concentraciones altas va a disminuir la capacidad de adhesión celular, además de inducir apoptosis de células inflamatorias (Ross *et al.*, 2001). Otro de los radicales libres



implicados en el proceso inflamatorio es el anión superóxido, cuyo exceso provoca un aumento en la permeabilidad vascular (Pinho-Ribeiro *et al.*, 2015).

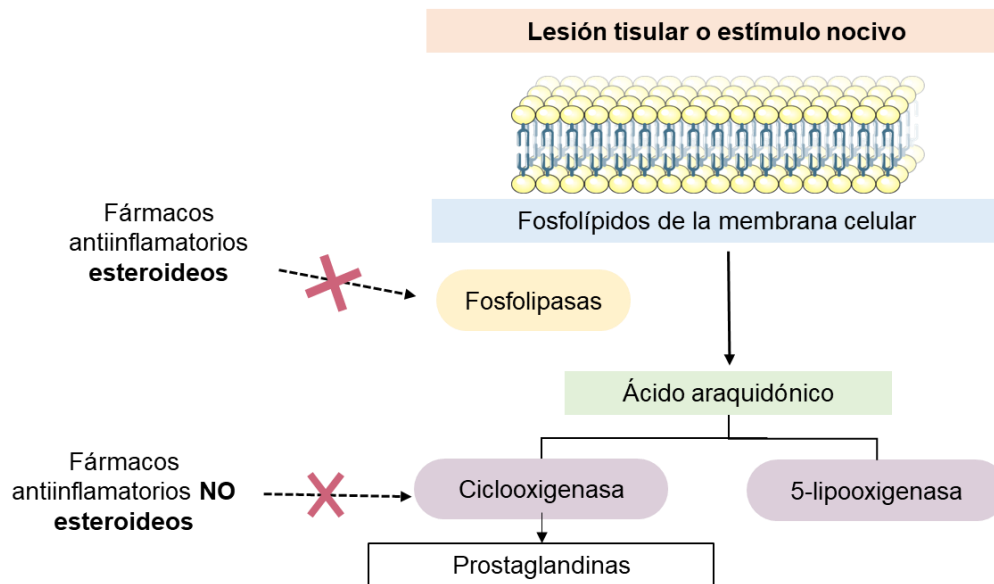
## II.2. Fármacos antiinflamatorios. Mecanismo de acción

### II.2.1 Fármacos antiinflamatorios esteroideos

También conocidos como glucocorticoides (GC), a nivel microscópico van a reducir el edema, aumentar los neutrófilos circulantes e inhibir la liberación del ácido araquidónico, disminuyendo la síntesis de prostaglandinas (Mejías-Delamano, 2010) (Figura 5).

### II.2.2 Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE's)

Son medicamentos con una estructura química heterogénea, cuyo objetivo es inhibir la enzima ciclooxigenasa (COX), provocando la oxidación del ácido araquidónico, impidiendo la producción de prostaglandinas (Malgor, 2013) (Figura 5).



**Figura 5.** Cascada del ácido araquidónico, sitios en donde actúan los fármacos antiinflamatorios. Adaptado de Mitchell, 2013.

### II.2.3 Ventajas del uso de fármacos antiinflamatorios

Además de las propiedades antiinflamatorias y analgésicas, algunos de ellos son antipiréticos y se ha señalado que muestran importantes efectos positivos para la salud como la protección cardiovascular. Bajas dosis de aspirina, contribuyen en la reducción

de eventos relacionados con enfermedades coronarias (de Gaetano & Collaborative Group of the Primary Prevention Project, 2001; Hansson *et al.*, 1998; Steering Committee of the Physicians Health Study Research Group, 1989; The Medical Research Council's General Research Framework, 1998), y disminuyen el riesgo de presentar enfermedad cerebrovascular isquémica, un padecimiento que tiene una incidencia mayor en mujeres (Ridker *et al.*, 1998). Por su parte, los glucocorticoides forman parte del tratamiento inmunosupresor utilizado para evitar el rechazo en trasplantes de órganos (Plaza-Pérez, 1983).

#### **II.2.4 Efectos adversos de los fármacos antiinflamatorios**

Como se mencionó anteriormente, este tipo de fármacos van a presentar múltiples efectos benéficos para la salud, no obstante, el consumo de los mismos puede provocar distintos efectos adversos.

Se ha señalado que el consumo prolongado de GC puede aumentar el riesgo de presentar diferentes afecciones entre las que se encuentran la retención de líquidos, hipertensión arterial, hiperglicemia, síndrome de Cushing, retraso en el crecimiento de niños, diabetes mellitus tipo 2, obesidad u osteoporosis (Gutiérrez-Restrepo, 2021; Mayo Clinic, 2020; Muñoz-Bellido, 2021). En el caso de la diabetes, los GC van a disminuir la secreción de insulina, con lo cual se inhibe la síntesis de glucógeno, provocando un aumento en los niveles de glucosa en plasma (Fardet & Feve, 2014). De igual manera, se ha indicado que el uso de GC es la causa más común de osteoporosis secundaria, ya que disminuyen la absorción de calcio intestinal e inducen una pérdida rápida de masa ósea (Gutiérrez-Restrepo, 2021).

Por otro lado, entre los efectos adversos de los AINE's destacan afecciones gastroduodenales como el sangrado de tubo digestivo y úlcera péptica, así como insuficiencia renal, entre otras (Sebastián-Domingo, 2002; Pérez, López & Grau, 2002). Se ha planteado que la inhibición de COX-1 podría ser la responsable de las afecciones típicas por el consumo de los AINE's y que la inhibición de la enzima COX-2 podría producir alteraciones en la función renal (Núñez-Cámara, Ventura-López & Martínez-Escudero, 2001).

### II.3 Búsqueda de nuevos fármacos antiinflamatorios

Diversos grupos de investigación han enfocado sus esfuerzos en la búsqueda de nuevos compuestos con potencial antiinflamatorio y con la posibilidad de menos efectos adversos, aislando sustancias contenidas en plantas y hongos a los que, de forma empírica, las comunidades les han atribuido esta propiedad.

En nuestro país se producen hongos que son catalogados como alimentos funcionales por su alto valor nutricional y por los efectos medicinales que presentan, tal es el caso de los géneros *Pleurotus* y *Lentinula* (Juárez-Pacheco, 2013; Rivera, Albarracín & Lares, 2017).

#### II.3.1 *Pleurotus djamor*

Es un hongo saprofito que se desarrolla en los trópicos, en el continente americano se distribuye en Argentina, Brasil, Colombia, Cuba, Venezuela y México (Salmones, 2017), Dentro del territorio mexicano se ha registrado su presencia en los estados de Jalisco, Veracruz, Morelos, Yucatán y Zacatecas (Gutiérrez, 2012).

Presenta un tamaño de 2 a 6 cm, su cuerpo fructífero consiste en un estípote corto, excéntrico o lateral con la tonalidad del píleo, un píleo o sombrero con forma redonda que al ensancharse se vuelve menos convexo y aplanado y láminas con crecimiento en forma de abanico (Guzmán, 2003) (Figura 6).

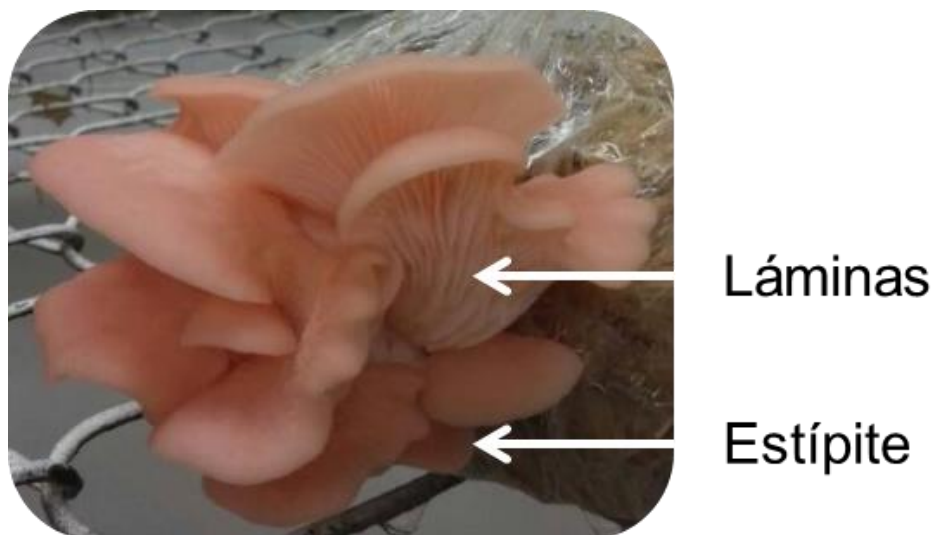


Figura 6. Morfología de *Pleurotus djamor*. Salmones, 2017.

En la medicina tradicional oriental, especies del género *Pleurotus* se han utilizado para la relajación de músculos, tendones y articulaciones, así como para aumentar la función renal entre otras (Hifas da Terra a). En *P. djamor* se han reportado compuestos bioactivos con propiedades anticancerígena, inmunomoduladora, antibiótica (antimicrobianas, antiviral, antifúngica), antiparasitaria, antioxidante, antiinflamatoria, antidiabética, antilipidémica y hepaprotectora (Salmones, 2017). Los extractos metanólicos de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus pulmonarius* y *Pleurotus florida* disminuyeron el edema plantar inducido en ratones y mejoraron la inflamación aguda y crónica, respectivamente (José *et al.*, 2002 y 2004 citados en Gregori *et al.*, 2007).

### II.3.2 *Lentinula edodes*

De manera silvestre, se distribuye en China, Japón, Corea, Tailandia, Nepal, Borneo, Filipinas y Nueva Guinea (Mata, Gaitán-Hernández & Salmones, 2020).

*Lentinula edodes* presenta un sombrero de 5 a 25 cm de diámetro con una tonalidad café en el centro oscuro y pálido en las orillas, en su etapa de madurez y tiene forma aplanada. Su estípite es de color café rojizo a café blanquecino, excéntrico, pero a veces central (Singer & Harris, 1987) (Figura 7).



**Figura 7.** Morfología de *Lentinula edodes*. Mata, Gaitán-Hernández & Salmones, 2020.

Este hongo, ha sido empleado en la medicina tradicional por ser considerado un alimento que activa la sangre, y potencializa el Jing-Qi (energía vital) y el sistema Xie-Qi

(resistencia a patógenos), además de ser utilizado en el tratamiento de enfermedades provocadas por un exceso de frío, dolor estomacal o cefaleas (Hifas da terra b; Marnys, 2020). Kim & Song (2014) señalaron que en Corea se usa para atender dolencias como la artritis, el cáncer, el refriado común y los trastornos gastroentéricos.

## **II.5 Hibridación**

Con la finalidad de aumentar aspectos de interés comercial y el valor nutricional de hongos comestibles, industrias como la alimentaria han optado por impulsar estrategias como los programas de mejoramiento genético, los cuales se basan en la recombinación genética mediante entrecruzamientos (Guadarrama-Mendoza, 2013).

La hibridación es uno de los mecanismos por el cual, características genéticas deseables presentes en cepas parentales se combinan con el fin de obtener cepas híbridas, las cuales probablemente tendrán dichas características (Sonnenberg *et al.*, 2005), para tal fin es importante conocer características relacionadas con el ciclo de vida, los requerimientos ambientales y nutricionales y la caracterización fenotípica de las cepas fúngicas (Chang & Miles, 2004).

### **II.5.1 Obtención de cepas híbridas**

Para la obtención de las cepas híbridas existen diferentes métodos para la obtención de material genético, entre los que se encuentran la recuperación y aislamiento de progenie meiótica y la desdicarriotización química.

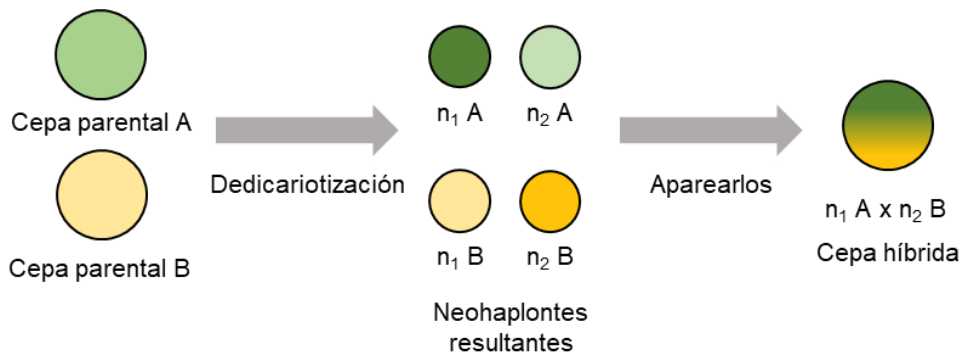
De manera general, la recuperación y aislamiento de progenie meiótica consiste en la recolección y aislamiento de esporas producidas por las cepas parentales de interés, para posteriormente aparearlas con la finalidad de identificar los tipos de compatibilidad y realizar entrecruzamientos compatibles, obteniendo así cepas híbridas (Guadarrama-Mendoza, 2013). Una de las mayores desventajas que tiene esta técnica es el poco control de las características en las cepas híbridas, por lo que algunos híbridos no presenten mejoras respecto a sus parentales (Gaitán-Hernández, 2000; Salmones, 2004).

### II.5.1.1 Desdicariorización química

Para la obtención de cepas híbridas mediante este proceso (Figura 8), es necesaria la desdicariorización de la cepa parental; es decir, separar de manera artificial los dos monocariontes también llamados neohaplontes, que constituyen la cepa parental, empleando sustancias químicas como el taurocolato de sodio, el ácido cólico o soluciones de peptona con glucosa. Posteriormente, se aparean los neohaplontes resultantes de dos cepas parentales diferentes, las cepas híbridas resultantes podrían ser intergénero es decir diferentes géneros o interespecies, las cuales resultan de la combinación de dos cepas del mismo género (Miles & Raper, 1956; Ramírez-Carrillo, 2011).

La reducción del tiempo empleado para la obtención de genotipos presentes en las cepas parentales de interés es una de las mayores ventajas que presenta este método. Adicionalmente, la composición genética de los neohaplontes va a permitir que se expresen características genéticas deseables de las cepas parentales en las cepas híbridas (Ramírez-Carrillo, 2011; Valenzuela-Cobos, 2018).

En la Figura 9, podemos observar un ejemplo de una cepa híbrida y las cepas parentales de la misma.



**Figura 8.** Obtención de cepas híbridas mediante desdicariorización química. Adaptado de Oropeza-Guerrero, 2017.



**Figura 9.** Fructificaciones de las cepas parentales *Pleurotus djamor* (A), *Lentinula edodes* (B) y su cepa híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub> (C). Valenzuela-Cobos, 2018.

### III. ANTECEDENTES

#### III.1 Los hongos como alternativa de fármacos antiinflamatorios

En diferentes civilizaciones, los hongos además de representar una importante fuente de alimento por sus altos niveles de proteínas, nutrientes y vitaminas contienen una amplia gama de metabolitos secundarios, los cuales les brindan múltiples propiedades biológicas (González-Morales, Ribas-Aparicio & Burrola-Aguilar, 2022). Existen evidencias que señalan el potencial antiinflamatorio que diferentes hongos presentan.

En 1991 Stavinoha *et al.* evaluaron las propiedades antiinflamatorias de los extractos acuoso y de acetato de etilo de los cuerpos fructíferos de *Ganoderma lucidum*, siendo este último extracto el más efectivo como un agente antiinflamatorio. Posteriormente, del extracto de acetato de etilo aislaron un compuesto activo con actividad antiinflamatoria similar a la hidrocortisona, sin los efectos adversos que el consumo de este fármaco antiinflamatorio puede presentar.

Wen *et al.* (2011), evaluaron el efecto antiinflamatorio del extracto metanólico de *Antrodia cinnamomea* en un modelo *in vivo* de edema plantar inducido por carragenina y en uno *in vitro* en células RAW 264.7 estimuladas por lipopolisacáridos (LPS). Los autores reportaron que el extracto de *A. cinnamomea* inhibió a TNF- $\alpha$  e IL-6 (citoquinas proinflamatorias) y otros mediadores como el NO y PGE<sub>2</sub>, además de disminuir el edema de forma dosis dependiente.

Estudios han señalado que algunas especies del género *Pleurotus* muestran actividad antiinflamatoria, por ejemplo, Jose *et al.* (2004) evaluaron esta propiedad en el extracto metanólico de *P. florida* en el modelo de edema plantar inducido por carragenina y formalina. Señalaron que el extracto metanólico en concentraciones de 500 y 1000 mg/kg inhibió la inflamación aguda inducida por carragenina y la inflamación crónica inducida por formalina, además indicaron que el efecto que presentó el extracto (42% de inhibición en el modelo de inflamación crónica) fue comparable con el del fármaco antiinflamatorio, diclofenaco (41 % de inhibición).

Otro ejemplo del potencial antiinflamatorio del género *Pleurotus* es el estudio realizado por Adebayo *et al.* en el 2012, en el que señalaron que el polisacárido LAU 09 de *P.*



*pulmonaris*, mostró un mayor porcentaje de inhibición del edema plantar inducido por carragenina (83.33%) respecto a su fármaco de referencia, diclofenaco (33.33%). De igual manera, el edema plantar inducido por formalina presentó mejor respuesta antiinflamatoria, al inhibir un 92.37% el edema, mientras que el diclofenaco solo inhibió un 84.73%.

### **III.2 *Pleurotus djamor* y *Lentinula edodes*. Estudios experimentales**

A lo largo de los años diferentes investigaciones realizadas con *Pleurotus djamor* y *Lentinula edodes* han demostrado que estos hongos son fuente de metabolitos secundarios con potencial actividad biológica. A continuación, se presentan los estudios más relevantes en los que se han evaluado las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de extractos obtenidos a partir de diferentes partes de los hongos.

Guzmán *et al.* en el 2009, evaluaron la capacidad antioxidante del extracto etanólico de cuerpos fructíferos de *P. djamor*, mediante los métodos de DPPH y ABTS. Los resultados de esta investigación arrojaron que el extracto de *P. djamor* mostraba potencial actividad antioxidante, esto de acuerdo con los datos de IC<sub>50</sub> obtenidos por los ensayos con DPPH (115 µg/mL) y ABTS (29.37 µg/mL).

En ese mismo año (2009), Ávila-Castañeda determinó la capacidad antioxidante de los extractos crudo metanólico, hexánico, clorofórmico y acetato de etilo, de cuerpos fructíferos de *L. edodes* mediante el método de DPPH. La autora indicó que el extracto crudo presentaba la mayor capacidad de eliminación de radicales libres en concentraciones de 0.25 y 2 mg/mL (41.1-92.9%). Mediante la caracterización de los componentes presentes en el extracto crudo, la actividad antioxidante se atribuyó a la presencia de compuestos polifenólicos.

En el 2013, Mishra *et al.* estimaron el contenido de fenoles totales, la actividad de barrido de radicales libres (ensayo DPPH) y la actividad quelante de los extractos miceliales de siete especies del género *Pleurotus* (*P. citrinopileatus*, *P. djamor*, *P. eryngii*, *P. flabellatus*, *P. florida*, *P. ostreatus* y *P. sajor-caju*) y de *Hypsizygus ulmarius*. Los autores reportaron que tanto el extracto de *P. eryngii* como el de *P. djamor* fueron los que presentaron el

mayor contenido de fenoles y la mejor actividad de barrido de radicales libres en una concentración del 100% en comparación con sus estándares, la vitamina C y E.

Khaund & Joshi (2016) evaluaron la actividad antioxidante, antiinflamatoria, el contenido fenólico total y de flavonoides de un extracto etanólico de cuerpos fructíferos de *L. edodes*. Reportaron que dicho extracto inhibió el 61.33% la presencia de radicales libres y mostró actividad antiinflamatoria eficaz ( $50 \pm 4.40\%$ ) en un modelo *in vitro* (prueba de estabilización de la membrana de glóbulos rojos humanos).

Sudha *et al.* en el 2016 realizaron un estudio comparativo de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y acuosos de cuerpos fructíferos de *P. djamor*. Los autores analizaron el contenido de fenoles totales y de flavonoides en el extracto, así como la actividad de barrido de radicales libres mediante los métodos de DPPH, DMPD, CUPRAC, y la actividad quelante de metales. Reportaron que ambos extractos mostraban eficiente actividad de barrido (DPPH y DMPD), el extracto metanólico fue el que presentó mayor cantidad de fenoles (5.95 mg de GAE/g) mientras que el extracto acuoso presentó un mayor contenido de flavonoides (6.35 mg de CAE/ g).

En 2020, Campuzano & Carpio estimaron la actividad antiinflamatoria de extractos acuosos de cuerpos fructíferos de *L. edodes* en modelos murinos, y hallaron que la dosis de 500  $\mu$ L inhibió un 38.8% la inflamación por edema auricular inducida por xileno.

### **III.2.1 Relación entre la capacidad antioxidante y la antiinflamatoria**

Ya se ha señalado que los radicales libres están estrechamente relacionados con en el proceso inflamatorio, esto por el papel que juegan como mediadores proinflamatorios. En diferentes estudios se han demostrado que extractos con potencial actividad antiinflamatoria pueden disminuir la presencia de radicales libres.

Im *et al.* (2014) determinaron los efectos antioxidantes y antiinflamatorios de los extractos de acetona, metanol y agua caliente de *P. florida*. La capacidad antioxidante la determinaron mediante los ensayos de poder reductor, efecto de barrido de radicales DPPH, y los efectos quelante sobre iones ferrosos; el extracto de acetona fue el que presentó la mejor respuesta antioxidante en los ensayos antes mencionados. De igual manera, el extracto de acetona (2 mg/mL) disminuyó significativamente la producción de

NO (óxido nítrico) un 34.80% en células RAW 264.7 inducidas por LPS. Para la evaluación de actividad antiinflamatoria *in vivo* emplearon el modelo de edema plantar inducido por carragenina, donde nuevamente el extracto de acetona fue el que mejor respuesta antiinflamatoria presentó, al tener un porcentaje de inhibición de 55.97% a una dosis de 50 mg/kg similar a la que presentó el fármaco de referencia, Indometacina (55.08 % de inhibición).

### III.3 Hibridación. Evaluación de aspectos comerciales

En los últimos años el consumo *per cápita* de hongos comestibles ha aumentado de 1kg/año (1997) a 4kg/año en el 2012. Entre los hongos con mayor producción a nivel mundial se encuentran *Agaricus* spp. (30%), *Pleurotus* spp. (27%) y *Lentinula edodes* con aproximadamente un 17% de hongos cultivados (Royse, 2014).

A nivel mundial, la producción de *Pleurotus* aumentó 618% (de 876 en 1997 a 6,288 toneladas en 2010). Mientras que en un periodo entre 1995 a 2010, la producción de *L. edodes* en Japón incrementó de 0.5 a 2 millones de toneladas (Chang, 2005; Royse, 2014).

Ambas especies presentan características de cultivo diferentes, *P. djamor* es un hongo nativo que requiere de temperaturas cálidas para su desarrollo, puede cultivarse en una amplia variedad de sustratos y los tiempos de cultivo son cortos (Salmones, 2017); mientras que *L. edodes* necesita sustratos específicos, temperaturas bajas y tiempos prolongados para su fructificación (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2015).

Dado las condiciones de cultivo y la importancia a nivel comercial que representan estas especies, industrias como la alimenticia han optado por emplear programas de mejoramiento genético, como la hibridación. Las investigaciones que se presentan a continuación son ejemplos de las mejoras que se pueden obtener a partir de este mecanismo.

Ramírez-Carrillo, 2011 obtuvo cepas híbridas de *L. edodes* y *P. ostreatus*, reportando valores de eficiencia biológica entre 7 y 125%, los cuales se consideran altos en comparación con su cepa parental *P. ostreatus* (55-57%) o lo reportado por Royse (2001), para una producción comercial de *L. edodes* (60 a 80%).

Valenzuela-Cobos en el 2018, evaluó características morfológicas y de producción, y el valor nutricional de híbridos de *Pleurotus* x *Lentinula*, obtenidos mediante desdicarización química, encontrando que el híbrido PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub> presentó la mayor tasa de eficiencia biológica, 141.86% cultivada en sustrato de paja de trigo y 120.01% en una mezcla de aserrín y paja de trigo. Además, reportó que el híbrido PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub> redujo el tiempo de cultivo total que fue de 58 días para presentar 3 cosechas, comparándolo con 62 días que tardó la cepa parental *P. djamor*.

#### **III.4 Actividad biológica de cepas híbridas**

Hasta el momento de la revisión son pocos los estudios que han evaluado las propiedades biológicas de cepas híbridas, destacando el estudio realizado por Valencia del Toro *et al.* (2012) quienes evaluaron la actividad antibacteriana de los extractos hexánico y metanólico de cepas parentales (POS, SEC, PCM y UAP9) e híbridas de *Pleurotus* spp. Los autores señalaron que las cepas híbridas SAUA (SEC<sub>1</sub> x UAP9<sub>1</sub>), SAUB (SEC<sub>1</sub> x UAP9<sub>2</sub>) y UBPO (UAP9<sub>1</sub> x POS<sub>1</sub>) fueron las que presentaron mejor respuesta antibacteriana respecto de sus parentales.

En otro estudio, Oropeza-Guerrero (2017), estimó la productividad y evaluó el contenido de fenoles y/o flavonoides totales; así como la actividad antioxidante de las cepas parentales silvestres de *P. djamor* var. *djamor* y *P. djamor* var. *Roseus*, y de cuatro cepas híbridas y dos reconstituidas. Las cepas híbridas H1, H2, H3 y H4 presentaron el mayor contenido de fenoles totales y la mejor respuesta antioxidante.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

En la búsqueda de nuevas sustancias o compuestos con efecto antiinflamatorio y con la posibilidad de presentar menos efectos adversos, se han estudiado las propiedades funcionales de los hongos comestibles.

Como se ha señalado, existe evidencia que cepas fúngicas parentales, tienen actividad antioxidante, antiinflamatoria, inmunomoduladora, antitumoral, antiviral, antibacteriana, entre otras. Sin embargo, pocas son las investigaciones en las que se han evaluado las propiedades biológicas de cepas híbridas, de las que, hasta el momento de la revisión, solo hay reportes de su actividad antibacteriana y capacidad antioxidante. Por lo que, con la finalidad de profundizar en el estudio de la actividad biológica de las cepas híbridas, en el presente estudio se ha planteado la siguiente pregunta de investigación.

**¿Los extractos hexánico y etanólico de los cuerpos fructíferos de la cepa híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub> presentara actividad antiinflamatoria?**

#### V. HIPÓTESIS

Si las cepas parentales *Pleurotus djamor* y *Lentinula edodes* han demostrado tener metabolitos secundarios con efecto antiinflamatorio y con capacidad antioxidante, se esperaría que los extractos hexánico y etanólico de la cepa híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub> conservaran el potencial antiinflamatorio de las cepas parentales.

## VI. OBJETIVOS

### VI.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antiinflamatoria de los extractos hexánico y etanólico de la cepa híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>, en un modelo murino de inflamación aguda.

### VI.2 Objetivos particulares

- Calcular el porcentaje de inflamación y el porcentaje de inhibición usando el modelo de edema auricular inducido con TPA
- Identificar los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico mediante análisis preliminar fitoquímico.
- Identificar y cuantificar por HPLC ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides presentes en los extractos hexánico y etanólico de la cepa híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### VII.1 Cepa fúngica

Los cuerpos fructíferos secos de la cepa híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub> fueron obtenidos y proporcionados por el Laboratorio de Cultivos Celulares de UPIBI-IPN.

### VII.2 Animales

Se utilizaron 42 ratones macho de la cepa Hsd:ICR (CD-1®) con un peso entre los 30 y 40 g, procedentes del Bioterio de la FES Iztacala. Se trasladaron al bioterio del Laboratorio de Farmacobiología donde se mantuvieron a una temperatura de 22°C ± 1°C con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h y con alimento y agua *ad libitum*.

### VII.3 Obtención de extractos

**Extracto hexánico (Exto Hx).** Los carpóforos se molieron y la harina obtenida (3 g) se extrajo en un equipo de Soxhlet. El exceso de disolvente se eliminó concentrando el extracto en un rotavapor BUCHI modelo R-205 (T=40°C).

**Extracto etanólico (Exto EtOH).** Los carpóforos se molieron y la harina obtenida (5.9 g) se extrajo por maceración sucesiva en una solución de etanol : agua (70 : 30). El exceso de disolvente se retiró por secado a temperatura ambiente.

Cada uno de los extractos obtenidos se almacenó en viales color ámbar para los siguientes ensayos.

### VII.4 Preparación de los fármacos y del extracto

Con el agente irritante 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) se preparó una disolución etanólica de 2.5 µg/10 µL. El fármaco de referencia Indometacina (1 mg/10 µL) se disolvió en agua destilada. Con los Exto Hx y EtOH de la cepa PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub> se prepararon las dosis de 125 y 250 µg/10 µL utilizando como disolvente agua destilada.

### VII.5 Actividad antiinflamatoria. Edema auricular inducido por TPA

La actividad antiinflamatoria se evaluó, siguiendo con ligeras modificaciones, el procedimiento descrito por Young *et al.* (1983) con el modelo murino *in vivo* (Figura 10). Los animales se asignaron al azar en seis grupos independientes (n=7).

A todos los ratones se les aplicó en la oreja derecha 2.5 µg/10µL/oreja de TPA disuelto en etanol, mientras que en la oreja izquierda solo recibieron vehículo (etanol 10 µL/oreja). Diez minutos después, sobre la oreja derecha se realizaron aplicaciones locales de los siguientes tratamientos. Uno de los grupos recibió el fármaco de referencia Indometacina (1 mg/10 µL/oreja), dos grupos recibieron una de las dos dosis del Exto Hx (125 o 250 µg/10µL/oreja), a los otros dos grupos se les aplicó una de las dosis del Exto EtOH (125 o 250 µg/10µL/oreja) y al grupo restante no se le aplicó tratamiento antiinflamatorio permaneciendo sólo con la aplicación de TPA (grupo Control). Cuatro horas después, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, y con ayuda de un sacabocados se obtuvieron biopsias circulares (6 mm de diámetro) de cada oreja.

El edema se calculó por diferencia de pesos (mg) entre la oreja que recibió el tratamiento (derecha) y la que recibió el vehículo etanol (izquierda).

Para calcular el porcentaje de inflamación, se empleó la siguiente formula, en donde **W<sub>t</sub>** es el peso de la sección de la oreja tratada y **W<sub>o</sub>** es el peso de la oreja no tratada.

$$\% \text{Inflamación} = \frac{W_t - W_o}{W_o} \times 100$$

En el caso del porcentaje de inhibición, este se calculó con la siguiente formula:

$$\% \text{Inhibición} = \frac{I_c - I_t}{I_c} \times 100$$

En donde:

**I<sub>c</sub>** equivalente al porcentaje de inflamación media del grupo Control

**I<sub>t</sub>** equivalente al porcentaje de inflamación media de cada grupo tratado



Actividad antiinflamatoria de cuerpos fructíferos de la cepa híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>

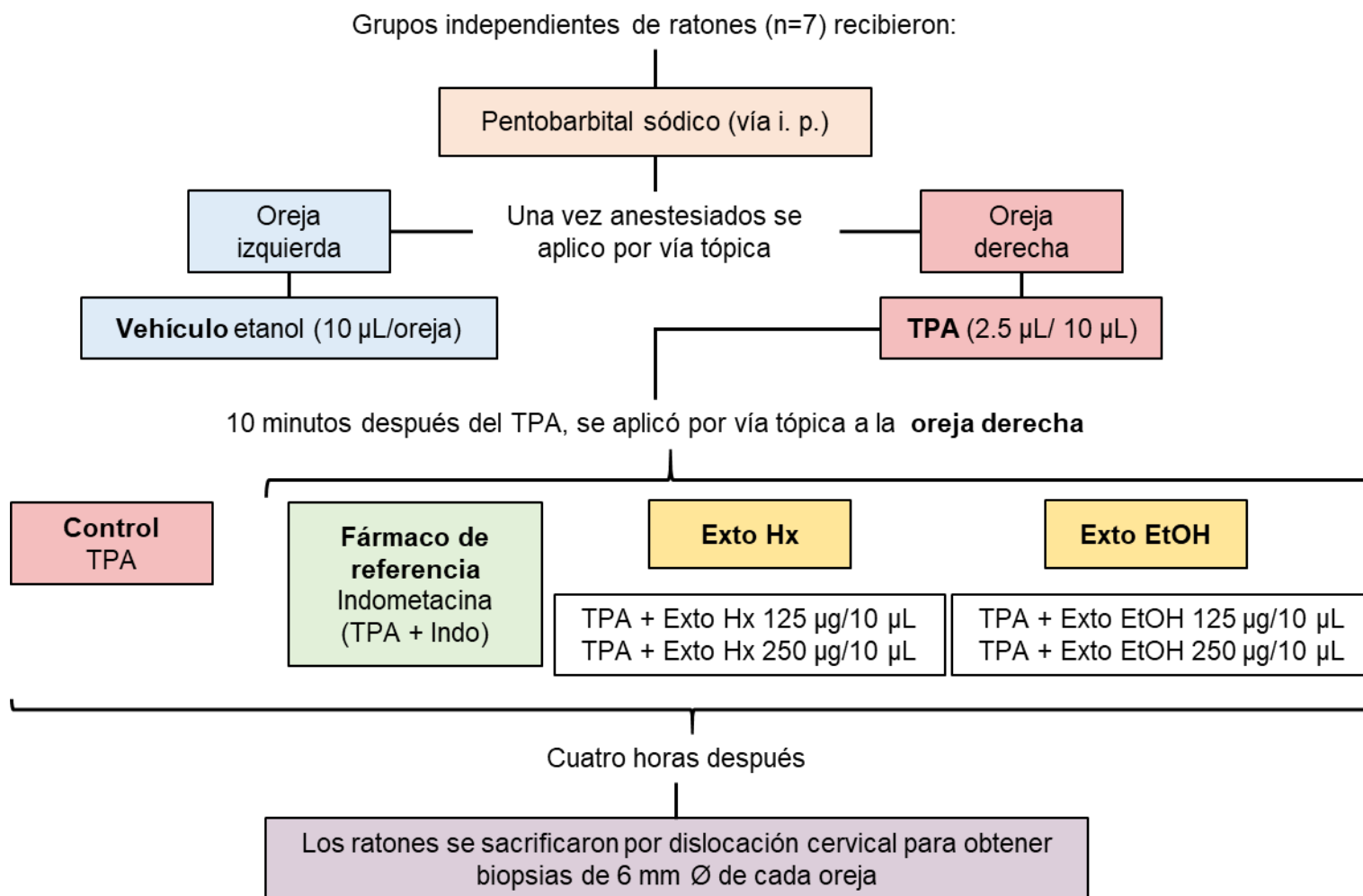


Figura 10. Diagrama del procedimiento para evaluar actividad antiinflamatoria siguiendo el Modelo de Edema Auricular inducido con TPA

## **VII.7 Análisis químico**

### **VII.7.1 Análisis preliminar fitoquímico**

La presencia de los principales metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de la cepa fúngica híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>, se determinó mediante las reacciones de coloración y/o precipitación de acuerdo a la metodología descrita por Valencia del Toro & Garín-Aguilar (2010).

#### **Alcaloides**

Para la determinación de alcaloides en el Exto EtOH, se tomó una muestra del extracto y se le agregó ácido clorhídrico al 10%. Posteriormente se calentó a ebullición y una vez frío, se filtró la solución para realizarse las pruebas con los reactivos Dragendorff y Sonneschein, ambas pruebas se consideran positivas si se forma un precipitado naranja.

#### **Flavonoides**

Una muestra de extracto se disolvió en etanol absoluto, esta solución se empleó para realizar la reacción de Shinoda y la de hidróxido de sodio al 10%. En la primera reacción, se agregó ácido clorhídrico concentrado, si hay un cambio a tonalidades rojas indica la presencia de auronas o chalconas. Por otro lado, para la reacción con hidróxido de sodio, al extracto se le agrega hidróxido de sodio, en caso de presentarse una coloración de amarillo a rojo señalan la presencia de xantonas y flavonas; de café a naranja de flavonas; de púrpura a rojo de chalconas y las azules de antocianinas.

#### **Glicósidos cianogénicos**

Se preparó una disolución del extracto con ácido clorhídrico al 10% y cloroformo. Se calentó a baño María con una tira de papel filtro con el reactivo de Grignard, la prueba se considera positiva en caso de formarse una mancha rosa a roja en el papel filtro.

#### **Azúcares reductores**

Se tomó una muestra de extracto y se le agregó hidróxido de sodio al 10% hasta tener un pH de 11. La determinación de azúcares reductores en el extracto se realizó mediante la reacción de Fehling y la reacción de Benedict. Los tubos con los reactivos

correspondientes se calentaron a baño María, la formación de un precipitado de color naranja a rojo nos señala la presencia de azúcares reductores.

### **Saponinas**

Para identificar saponinas en el extracto se realizaron tres pruebas, la prueba de altura y estabilidad de espuma en donde una muestra de extracto diluido se agito vigorosamente y se le tomo la altura de la espuma (en caso de presentar). Esta prueba se considera positiva, si la altura es de 8 a 10 mm y se mantiene por 30 minutos. Otra de las pruebas es la reacción de Lieberman Bouchard, para la cual, al extracto se le agrego ácido anhídrido y se estratificó con ácido sulfúrico concentrado. Si en la interfase se presentan coloraciones de azul a verde indica la presencia de saponinas esteroidales y la coloración rosa, rojo, magenta o violeta, la presencia de saponinas triterpenoides. Por último, para la reacción de Rosenthaler, al extracto se le agregó el reactivo de Rosenthaler y se estratificó con ácido sulfúrico concentrado, en caso de presentarse coloraciones violetas la prueba se consideró positiva para saponinas triterpenoides.

### **Taninos**

Se preparó una solución con el extracto, agua destilada y cloruro de sodio al 2%, la cual se calentó a ebullición y una vez fría, la solución se filtró. Se realizaron tres pruebas, la reacción con gelatina, la reacción de cloruro férrico y la reacción con ferrocianuro de potasio al 1%. En la primera reacción al agregar reactivo de gelatina, la formación de un precipitado blanco, nos indica la presencia de taninos. Por otro lado, en la reacción de cloruro férrico se le agregó cloruro férrico al 1% en caso de formarse coloraciones de azul a negro nos señala la presencia de derivados del ácido gálico o coloraciones verdes para derivados del catecol. Por último, la presencia de compuestos fenólicos en el extracto se determinó con la reacción de potasio al 1% (en caso de presentarse una coloración azul).

### **Quinonas**

Para la determinación de quinonas en el extracto, se realizaron tres reacciones, en la reacción de hidróxido de amonio, a una pequeña porción del extracto se le añadió hidróxido de sodio, se considera positiva para antraquinonas en caso de presentar coloración roja dentro de los dos primeros minutos. Al igual que en la reacción anterior, en la reacción con ácido sulfúrico se va a considerar positiva, si presenta una coloración

roja. Por último, en la reacción de Börntrager, se diluyó una porción del extracto en agua destilada, la solución se filtró y a la solución filtrada se le agregó hidróxido de potasio al 5%. Posteriormente se calentó a ebullición, una vez fría se le retiró la fase acuosa y se le agregó hidróxido de potasio al 5%. La presencia de benzoquininas se puede determinar si la solución presenta color rojo.

### **Cumarinas**

En la reacción de Erlich, al extracto se le agregó reactivo de Erlich y ácido clorhídrico concentrado, una coloración naranja indica la presencia de cumarinas. Por otro, en la reacción con hidróxido de amonio, al extracto se le agregó etanol e hidróxido de amonio concentrado. En caso de presentar una fluorescencia azul-violeta, la prueba se considera positiva.

### **Glicósidos cardiacos**

A una porción de extracto se le agregó piridina, nitroprusiato de sodio al 5% e hidróxido de potasio (reacción de Legal), una coloración roja indica la presencia de glucósidos cardiacos. Para la siguiente prueba (reacción de Baljet), a una muestra del extracto se le añadió reactivo de Baljet, una coloración naranja a roja señala la presencia de glucósidos cianogénicos.

### **Sesquiterpenlactonas**

La identificación de sesquiterpenlactonas se realizó con la reacción con hidroximato férrico, para lo cual a una muestra de extracto se le añadió clorhidrato de hidroxilamina 2 N e hidróxido de potasio 2 N. Esta solución se calentó a ebullición y al enfriarse, la solución se llevó a un pH de 1 con ácido clorhídrico 0.5 N. Por último, se agregó cloruro férrico, la prueba se considera positiva si la solución presenta tonalidades rojas, violetas o rosas.

### **VII.7.2 HPLC. Cromatografía líquida de alta resolución**

Con la finalidad de identificar y cuantificar ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides presentes en el Exto Hx y el EtOH de la cepa híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>, se utilizó un cromatógrafo de líquidos Hewlett Packard® serie 1100, equipado con un inyector automático (Agilent®)

serie 1200 Mod. G1329A) y un detector de arreglo de diodos Hewlett Packard® serie 1100.

Se pesó en un tubo eppendorf 0.0080 g de muestra de Exto EtOH y se disolvieron en metanol grado HPLC al 80%, en el caso del Exto Hx se pesó una muestra de 0.0081 g. Los tubos bien sellados se incubaron por 1 hora a 60°C en baño María. Posteriormente, el contenido de cada uno de los eppendorf se filtró utilizando Acrodiscos PVDF de 0.45 mm y el filtrado se almacenó en viales ámbar los cuales se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis. Para obtener la curva de calibración de los ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides se utilizaron como referencia estándares comerciales marca Sigma-Aldrich, USA.

### **VII.8 Análisis estadístico**

Los resultados del ensayo biológico se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Seguida de una prueba Duncan para comparaciones múltiples. Los datos se reportaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. Para este análisis se utilizó el programa SPSS versión 22.

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los hongos comestibles de los géneros *Pleurotus* y *Lentinula* han sido estudiados experimentalmente por poseer compuestos con actividad antiinflamatoria. Ya que la hibridación es un proceso de mejoramiento genético y se ha evidenciado que la cepa híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub> obtenida a partir de las parentales *Pleurotus djamor* y *Lentinula edodes* mejoró sus parámetros de productividad respecto de sus parentales. En esta investigación se exploró la actividad antiinflamatoria y antioxidante de los extractos Hx y EtOH de la cepa híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>.

### VIII.1. Actividad antiinflamatoria. Edema auricular inducido por TPA

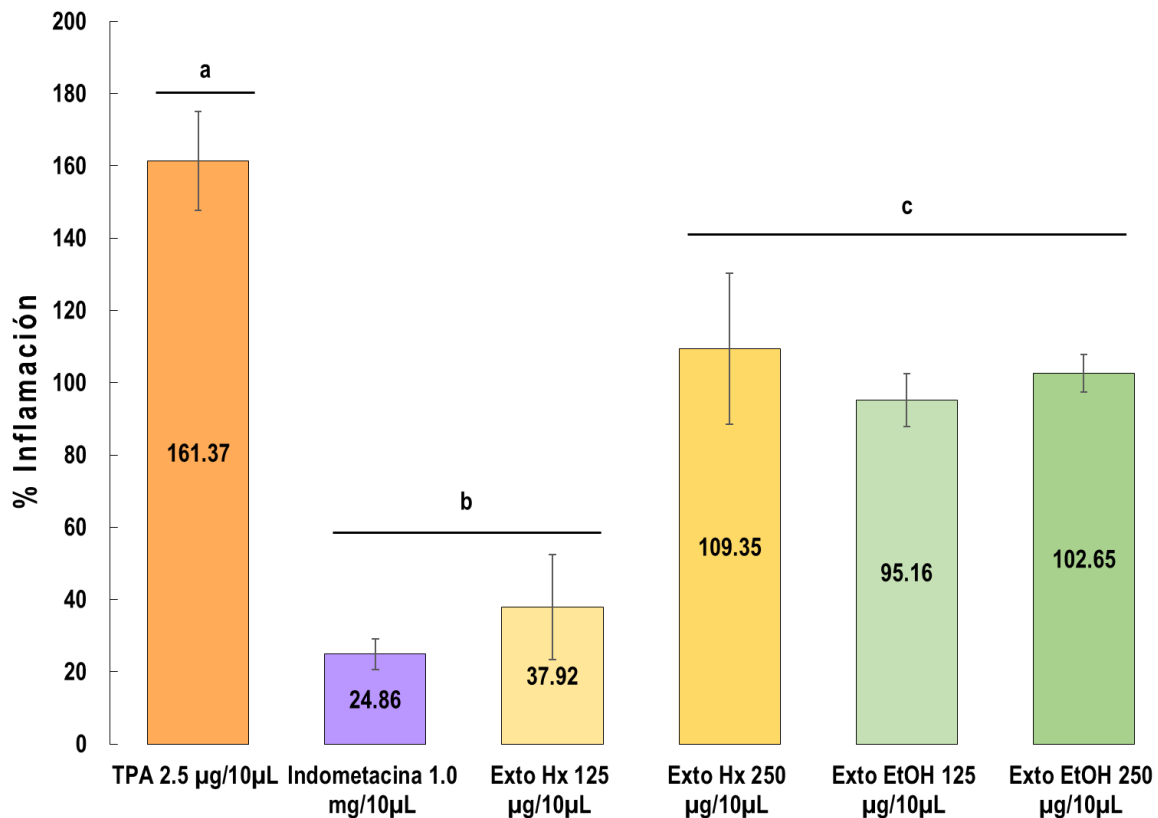
En la Figura 11 se presenta el efecto de los Exto Hx y Exto EtOH de la cepa híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub> sobre el porcentaje de inflamación del edema inducido por TPA. El ANOVA de una vía detectó diferencias significativas entre los tratamientos al analizar este factor [ $F_{(5,41)} = 16.192$ ,  $p = 0.0001$ ] y la prueba post hoc de Duncan formó tres grupos. Grupo **a** donde se encuentra el agente irritante TPA, grupo **b** integrado por el fármaco de referencia (Indometacina) y el Exto Hx 125 µg/10µL; el grupo **c** lo integran el Exto Hx 250 µg/10µL y el Exto EtOH 125 y 250 µg/10µL. Estadísticamente, los datos del edema (mg) también presentaron diferencias significativas [ $F_{(5, 41)} = 19.948$ ,  $p = 0.0001$ ], formándose los mismos tres grupos con la prueba post hoc de Duncan (Cuadro 2). Por lo que respecta a la reducción del edema, en el Cuadro 2 también se muestran los valores del porcentaje de inhibición obtenidos con los Exto Hx y el Exto EtOH de la cepa híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>, los que oscilaron entre el 32.24 y el 76.50%. Es importante hacer notar que la aplicación de 125 µg/10µL de Exto Hx redujo el edema un 76.50%, valor cercano a la reducción ocasionada por el fármaco de referencia Indometacina (84.60%).

En conjunto, los resultados pusieron de manifiesto que la aplicación de 125 y 250 µg/10µL del Exto Hx y Exto EtOH disminuyeron el edema inducido TPA, y que esta reducción fue mayor a una concentración de 125 µg/10µL de Exto Hx (76.50% de inhibición).

En González *et al.* (2011), se indica que la actividad antiinflamatoria de una sustancia es **moderada** cuando la inhibición es del 35 al 65% y que un extracto o fracción va a presentar un **buen efecto** antiinflamatorio cuando la inhibición es superior al 65%. Con

base en estos criterios, 125 y 250 µg/10µL de Exto EtOH presentaron actividad antiinflamatoria moderada, mientras que 125 µg/10µL de Exto Hx tuvo buen efecto antiinflamatorio.

Las diferencias entre la actividad antiinflamatoria presentadas con el Exto EtOH y el Exto Hx de la cepa híbrida, se pueden explicar en términos de la polaridad de los disolventes usados en la extracción. Extractos y fracciones obtenidas con disolventes polares y/o no polares presentan compuestos estructuralmente diferentes, lo cual contribuye al efecto antiinflamatorio de manera distinta (Franco *et al.*, 2013). Consistente con nuestros resultados, existe evidencia de que extractos no polares de plantas presentan mayor actividad antiinflamatoria, que los extractos polares. Tal es el caso del trabajo de Franco *et al.* (2007), quienes informaron que el porcentaje de inhibición de extractos etéreos de cálices de *Physalis peruviana* fue superior (56.2%) al del extracto etanólico (6.8%).



**Figura 11.** Media ± EEM del porcentaje de inflamación 4 h después de la aplicación del Exto Hx y Exto EtOH de la cepa PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub> (n=7).

**Cuadro 2.** Actividad antiinflamatoria del Exto Hx y Exto EtOH de la cepa fúngica híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub> en el modelo de edema auricular inducido por TPA.

| Tratamiento   | Dosis             | Edema $\pm$ ESM (mg)          | % Inhibición |
|---------------|-------------------|-------------------------------|--------------|
| TPA (Control) | 2.5 $\mu$ g/oreja | 13.45 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup> | —            |
| Indometacina  | 1.0 mg/oreja      | 2.13 $\pm$ 0.39 <sup>b</sup>  | 84.60        |
| Exto Hx       | 125 $\mu$ g/oreja | 3.27 $\pm$ 1.22 <sup>c</sup>  | 76.50        |
|               | 250 $\mu$ g/oreja | 8.28 $\pm$ 1.59 <sup>c</sup>  | 32.24        |
| Exto EtOH     | 125 $\mu$ g/oreja | 7.86 $\pm$ 0.57 <sup>c</sup>  | 41.03        |
|               | 250 $\mu$ g/oreja | 8.89 $\pm$ 0.40 <sup>c</sup>  | 36.39        |

Media del edema  $\pm$ EEM. Duncan formó tres grupos: **a:** TPA; **b:** Indometacina y Exto Hx 125  $\mu$ g/10 $\mu$ L; **c:** Exto Hx 250  $\mu$ g/10  $\mu$ L y Exto EtOH 125 y 250  $\mu$ g/10 $\mu$ L. Respecto al % de Inhibición, el Exto Hx 250  $\mu$ g/10 $\mu$ L mostró actividad antiinflamatoria submoderada, el Exto EtOH 125 y 250  $\mu$ g/10 $\mu$ L actividad antiinflamatoria moderada y el Exto Hx 125  $\mu$ g/10 $\mu$ L reportó buen efecto antiinflamatorio (González *et al.*, 2011).



## VIII.2 Análisis químico

### VIII.2.1 Análisis preliminar fitoquímico

El análisis preliminar fitoquímico mostró la presencia de alcaloides, flavonoides (flavonas y xantonas), saponinas triterpénicas, taninos, quinonas (antraquinonas), cumarinas y glicósidos cianogénicos (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Análisis preliminar fitoquímico realizado al extracto etanólico de la cepa fúngica híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>

| Metabolito              | Prueba                                     | Resultado |
|-------------------------|--|-----------|
| Alcaloides              | Reactivo de Dragendorff                    | +         |
|                         | Reactivo de Sonneschain                    | -         |
| <i>Flavonoides</i>      | Reacción de Shinoda                        | -         |
|                         | Reacción de hidróxido de sodio al 10%      | + *       |
| Glicósidos cianogénicos | Reactivo de Grignard                       | -         |
| Azúcares reductores     | Reacción de Fehling                        | -         |
|                         | Reacción de Benedict                       | -         |
| Saponinas               | Prueba de altura y estabilidad de espuma   | -         |
|                         | Reacción de Lieberman Bouchard             | -         |
|                         | Reacción de Rosenthaler                    | +**       |
| <i>Taninos</i>          | Reacción con gelatina                      | +         |
|                         | Reacción de cloruro férrico                | -         |
|                         | Reacción con ferricianuro de potasio al 1% | -         |
| Quinonas                | Reacción de hidróxido de amonio            | +***      |
|                         | Reacción con ácido sulfúrico               | +***      |
|                         | Reacción de Börntrager                     | -         |
| Cumarinas               | Reacción de Erlich                         | +         |
|                         | Reacción con hidróxido de amonio           | -         |
| Glucósidos cardiacos    | Reacción de Legal                          | -         |
|                         | Reacción de Baljet                         | +         |
| Sesquiterpenlactonas    | Reacción con hidroximato férrico           | -         |

Simbología: positivo (+), negativo (-), positivo para xantonas y flavonas (+\*), positivo para saponinas triterpenoides (+\*\*) y positivo para antraquinonas (+\*\*\*).

Entre los compuestos con actividad antiinflamatoria presentes en extractos y fracciones, obtenidos a partir de plantas y hongos se encuentran los flavonoides y taninos.

Taninos aislados de la corteza de la nuez de la india (*Anacardium occidentale* L.) mostraron actividad antiinflamatoria significativa en un modelo de edema plantar inducido por carragenina, inhibiendo un  $80.4 \pm 5.7$  % (Mota *et al.*, 1985).

Evaluando las propiedades antiinflamatorias de terpenoides y esteroides aislados de *Ganoderma tsugae*, se encontró que el ácido tsugárico A y el ácido 3-oxo-5 $\alpha$ -lanosta-8,24-dien-21-oico inhibieron la generación del anión superóxido inducido por fMLP/CB (fornil-metionil-leucil-fenilalanina), así como la acumulación de NO en medios de cultivo de células N9 (Ko *et al.*, 2008).

Respecto a los flavonoides, la fracción flavónica extraída de hojas de *Jungia rugosa*, presentó capacidad antioxidante inhibiendo un 97% del radical DPPH y disminuyó 43.8% el edema plantar inducido por carragenina (Enciso & Arroyo, 2011).

Con base en lo anterior, se puede sugerir que la presencia de flavonoides, terpenoides y taninos, detectados en el preliminar fitoquímico, o bien su sinergia, sean los responsables de la actividad antiinflamatoria observada con el Exto EtOH de la cepa híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>.

### **VIII.2.2 HPLC. Cromatografía líquida de alta resolución**

El análisis por HPLC para detectar ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides permitió identificar 11 compuestos en el Exto Hx y 12 compuestos en el Exto EtOH de la cepa híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>.

#### **VIII.2.2.1 Ácidos fenólicos**

En la Figura 12 se muestra el cromatograma de los ácidos fenólicos presentes en el Exto Hx de la cepa híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>: ácido vainillínico (0.5428 mg de Ác. Fenólico/g de Exto Hx), ácido ferúlico (0.1503 mg de Ác. Fenólico/g de Exto Hx) y ácido gálico (0.0911 mg de Ác. Fenólico/g de Exto Hx). Por otro lado, en el Exto EtOH solo se identificó un compuesto, el ácido beta resorcílico, en una concentración de 0.0232 mg de Ác. Fenólico/g de Exto EtOH (Figura 13). Es importante hacer notar que a todos estos

compuestos se les ha reportado actividad antiinflamatoria; inclusive, para algunos de ellos se ha establecido su mecanismo de acción.

El ácido vainillínico inhibió el edema plantar inducido por carragenina (10 y 30 mg/kg), e inhibió citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Calixto-Campos *et al.*, 2015). También se reportó que este compuesto inhibió la producción de IL-6, PGE<sub>2</sub> y NO y suprimió la expresión de COX-2 y la activación de NF- $\kappa$ B (Min-Cheol *et al.*, 2011); sugiriendo que el mecanismo antiinflamatorio que presenta el ácido vainillínico puede ser atribuido a la regulación del factor nuclear kappa inducido por linfocito B (NF- $\kappa$ B) y la caspasa-1. El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción que estimula citocinas como TNF- $\alpha$  o interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8) presentes en el proceso inflamatorio y moléculas de adhesión que participan en el reclutamiento de leucocitos (Hoesel & Schmid, 2013).

Por otro lado, el ácido ferúlico disminuyó la producción de NO inducida por LPS y redujo la expresión de iNOS y COX-2 (Shi *et al.*, 2021); mientras que el pretratamiento con este ácido redujo la expresión de ARNm de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas por LPS y la activación del inflamasoma NLRP3 inducido por LPS (Liu *et al.*, 2022). Se ha señalado que, los inflamasomas son complejos proteicos ubicados en el citoplasma que funcionan como sensores que pueden detectar infecciones por patógenos o desequilibrios metabólicos (Guo *et al.*, 2015). El inflamasoma NLRP3, también conocido como criopirina, es el encargado de activar la procaspasa-1 y de producir citocinas como, IL-1 $\beta$  e IL-8. (Suárez & Buevas, 2015).

El ácido gálico presentó efecto antiinflamatorio en el modelo *in vivo* de edema plantar inducido zymosan (Kroes *et al.*, 1991); mientras que *in vitro* redujo la expresión de ARNm de IL-1 $\beta$ , IL-6 (citocinas proinflamatorias), MCP-1, MCP-3 (proteínas quimiotácticas) y COX-2 (Yoon *et al.*, 2013). Este ácido también inhibió la expresión de TNF- $\alpha$  y la liberación de histamina en células estimuladas por el compuesto 48/80 (triclorhidrato de C48/80) y atenuó la activación de p38 MAPK y NF- $\kappa$ B (Kim *et al.*, 2006). Se ha señalado que, la expresión de la proteína p38 MAPK está regulada por estrés y/o estímulos inflamatorios entre los que se encuentran la radiación UV o la presencia de citocinas, y se encuentra involucrada en la expresión de mediadores proinflamatorios como TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , COX-2, entre otros (Yang *et al.*, 2014).

El ácido beta resorcílico, único ácido fenólico identificado en el extracto etanólico, es un compuesto asociado con la inhibición moderada de la peroxidación lipídica (Sroka & Cisowski, 2003). La lipoperoxidación lipídica es un mecanismo en donde la oxidación de enlaces  $\alpha$ -metilénicos de ácidos grasos insaturados ocasiona la fragmentación de lípidos de la membrana celular (Fagali, 2011). Ante la presencia de estímulos inflamatorios, los fosfolípidos de la membrana por acción de la fosfolipasa A2, se encargarán de liberar ácido araquidónico, un ácido graso poliinsaturado y uno de los principales intermediarios en el proceso inflamatorio (Clària, González-Pérez, Horrillo & López-Parra, 2007).

Los ácidos fenólicos presentes en el Exto Hx, han sido identificados en *L. edodes* (Ávila-Castañeda, 2009; Woldegiorgis *et al.*, 2014) y en *P. ostreatus* y *P. eryngii* (Alam *et al.*, 2010; Gąsecka *et al.*, 2015). En el caso del ácido beta resorcílico, hasta el momento de la revisión de la literatura, no se ha reportado su presencia en especies de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* ni en *Lentinula edodes*.

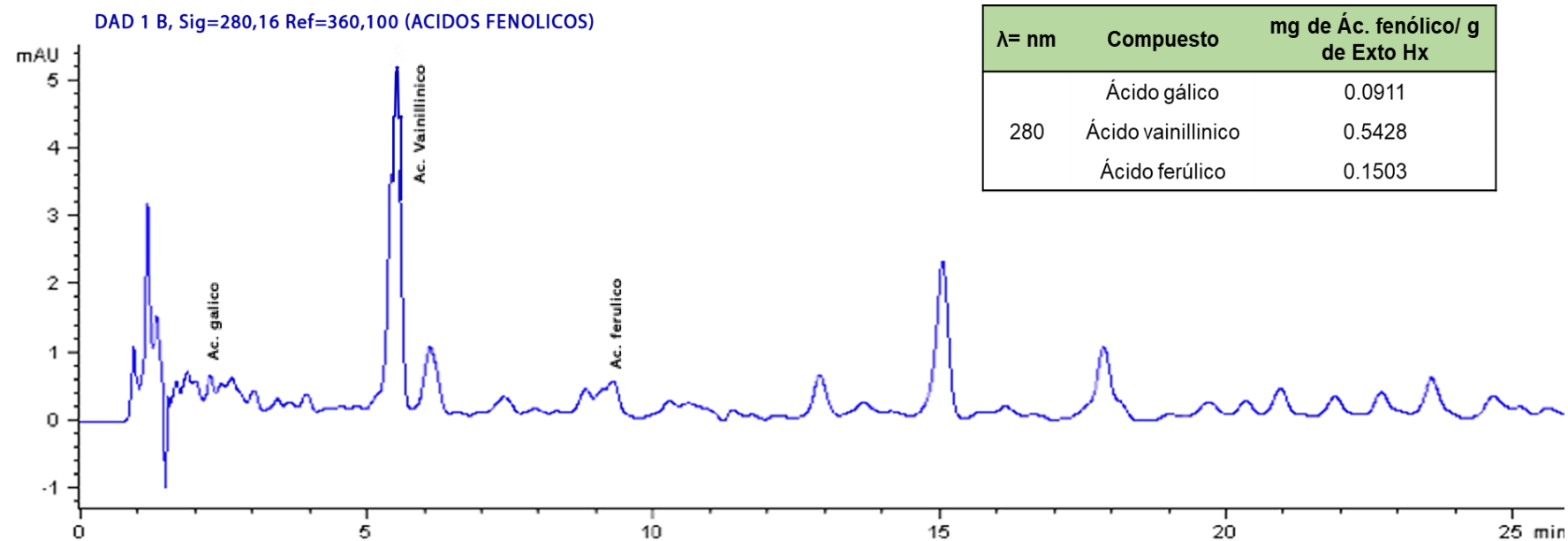
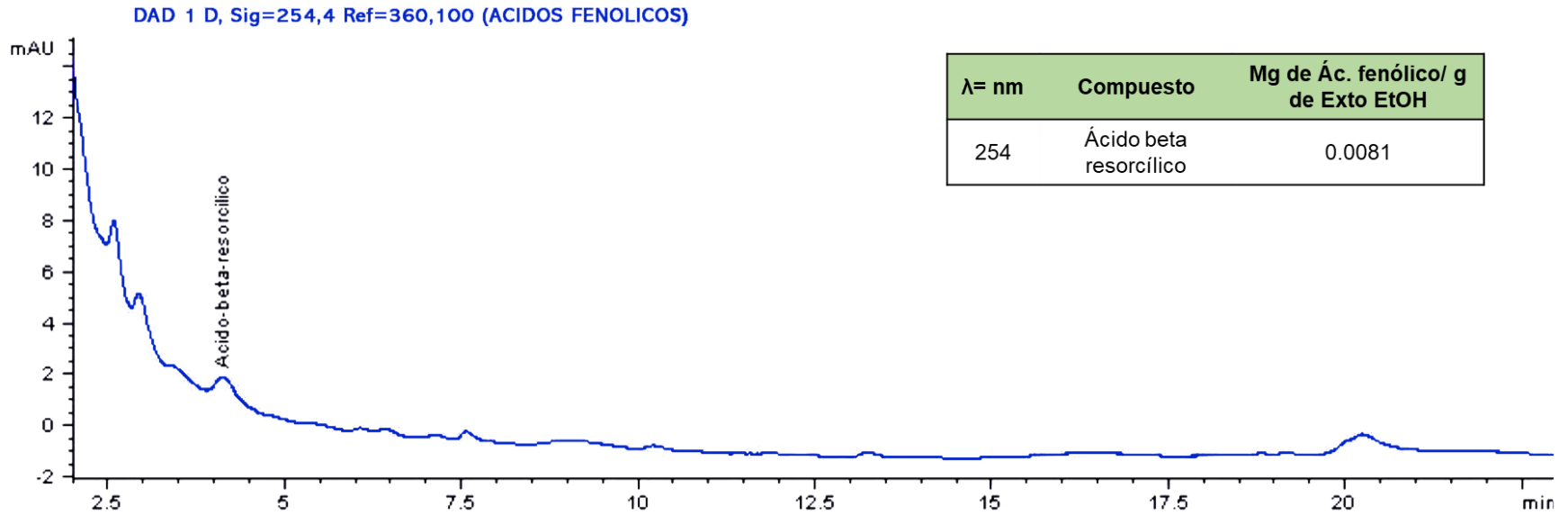


Figura 12. Cromatograma HPLC-Ácidos Fenólicos en el Exto Hx de la cepa fúngica híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>.



**Figura 13.** Cromatograma HPLC-Ácidos Fenólicos en el Exto EtOH de la cepa fúngica híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>.

### VIII.2.2.2 Flavonoides

El análisis por HPLC del Exto Hx de la cepa híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>, identificó tres flavonoides, Galangina en una concentración de 2.7355 mg de flavonoide/g de Exto Hx; Naringenina (2.6238 mg de flavonoide/g de Exto Hx) y Floritzidina en concentración de 0.2720 mg de flavonoide/g de Exto Hx (Figura 14). Y en la Figura 15 los cinco flavonoides presentes en el Exto EtOH: Quercetina (0.0298 mg de flavonoide/g de Exto EtOH), Rutina (0.0269 mg de flavonoide/g de Exto EtOH), Apigenina (0.0259 mg de flavonoide/g de Exto EtOH), Floritzina (0.0112 mg de flavonoides/g de Exto EtOH) y Catequina (0.0107 mg de flavonoide/g de Exto EtOH).

Se ha reportado que el flavonoide Galangina tiene efecto antiinflamatorio al reducir significativamente la producción de NO, así como los niveles de ARNm de IL-1 $\beta$ , IL-6 e iNOS (Jung *et al.*, 2014). En otro estudio, la galangina mostró efecto protector sobre la inflamación renal inducida por ácido úrico en células NRK-52E, al disminuir TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-18, y por inhibir la expresión de ARNm de iNOS, PTGS2 y NF-kB (Lu *et al.*, 2019). Una investigación más reciente sobre la evaluación antiinflamatoria de la galangina fue el realizada por Cai *et al.* (2021) quienes reportaron que dicho metabolito aumentó la producción de mediadores antiinflamatorios como IL-10 y TGF- $\beta$ . Prieto *et al.* (2002) señalan que TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformador-beta) estimula la reparación en tejidos, además de favorecer procesos como la quimiotaxis en macrófagos y linfocitos.

También en modelos murinos *in vivo* se evidenció que la administración tópica de 2% del flavonoide Naringenina disminuyó un 56% el edema auricular inducido con ácido araquidónico (AA) y un 62% el inducido por TPA (Escribano-Ferrer *et al.*, 2018). En otro estudio, con el modelo de edema plantar inducido con carragenina, la administración de naringenina durante una semana, previa a la inyección de la carragenina, disminuyó la inflamación al menos durante 5 horas (Chung *et al.*, 2019). El efecto antiinflamatorio de la naringenina se ha atribuido a su efecto inhibitorio sobre la producción de NO y PGE<sub>2</sub> (Kim, Park & Choi, 2012), así como al bloqueo de enzimas como COX-2 e iNOS,

responsables de la expresión de mediadores como IL-6, PGE<sub>2</sub> y NO (Pannu *et al.*, 2019).

Pensamiento-Niño (2022) evaluó la actividad biológica del extracto hidroalcohólico de la flor de Cardón (*Cylindropuntia rosea*) rico en florizina, catequina y quercetina, el cual presentó la mejor respuesta antiinflamatoria en el modelo de edema auricular inducido por TPA. El autor atribuyó el efecto antiinflamatorio a los compuestos encontrados en el extracto hidroalcohólico: ácidos fenólicos (Ác. gálico y p-cumárico), flavonoides (catequina, kaempferol y quercetina) los cuales inhiben mediadores inflamatorios como las enzimas ciclooxigenasas, lipoxigenasas y óxido nítrico sintasa inducible. Manjeet & Ghosh (1999) reportaron que quercetina (dosis de 20 µM) inhibió la producción de NO, y de TNF-α (concentración de 50 µM). En otro estudio, la expresión de COX-2 estimulada por citocinas y la expresión basal de COX fueron inhibidas por la quercetina (O' Leary *et al.*, 2004). En el modelo *in vitro* de macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS se encontró que los flavonoides galangina y quercetina disminuyeron la producción de IL-6, atenuaron la activación de NF-κB y modularon la expresión de iNOS.

El efecto antiinflamatorio de la Rutina se evaluó tanto en un modelo de inflamación aguda como crónica, los autores demostraron que la rutina fue más eficaz en la fase crónica (Guardia *et al.*, 2001). Hay evidencia que rutina suprime la producción de IL-1β inducida por DSS (Know *et al.*, 2005); disminuye de manera dosis dependiente, la producción de NO en células RAW 264.7 inducidas por LPS, la expresión de iNOS y de COX-2, así como los niveles de IL-6 y TNF-α (Karki *et al.*, 2013) y muestra actividad inhibitoria (de moderada a alta) de NF-κB inducido por TPA (Endrigger, Pezzuto & Braga, 2009).

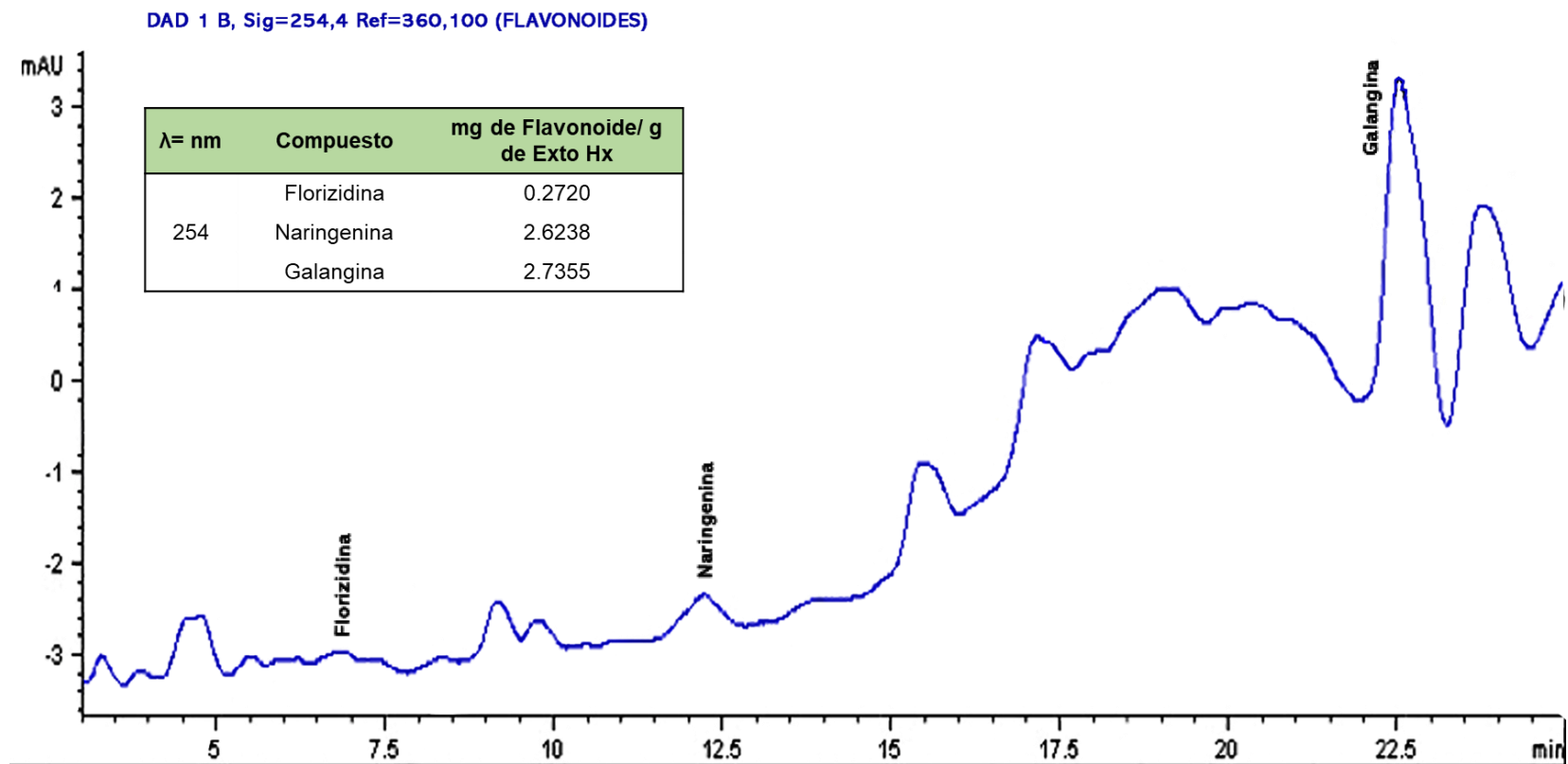
Apigenina inhibió la producción de PGE<sub>2</sub> y suprimió fuertemente los niveles de COX-2 e iNOS en el modelo de macrófagos activados inducidos por LPS (Liang *et al.*, 1999). Smolinski & Peska (2003), señalaron que el pretratamiento con apigenina disminuye la acumulación sérica de IL-6 y TNF-α inducidos por LPS. También se reportó que inhibió la producción de NO y redujo la expresión de TNF-α (Chandler *et al.*, 2010); los autores proponen que el efecto antiinflamatorio de la apigenina se debe a la regulación de factores como NF-κB y miembros de la familia de proteínas STAT (transdutora de señal



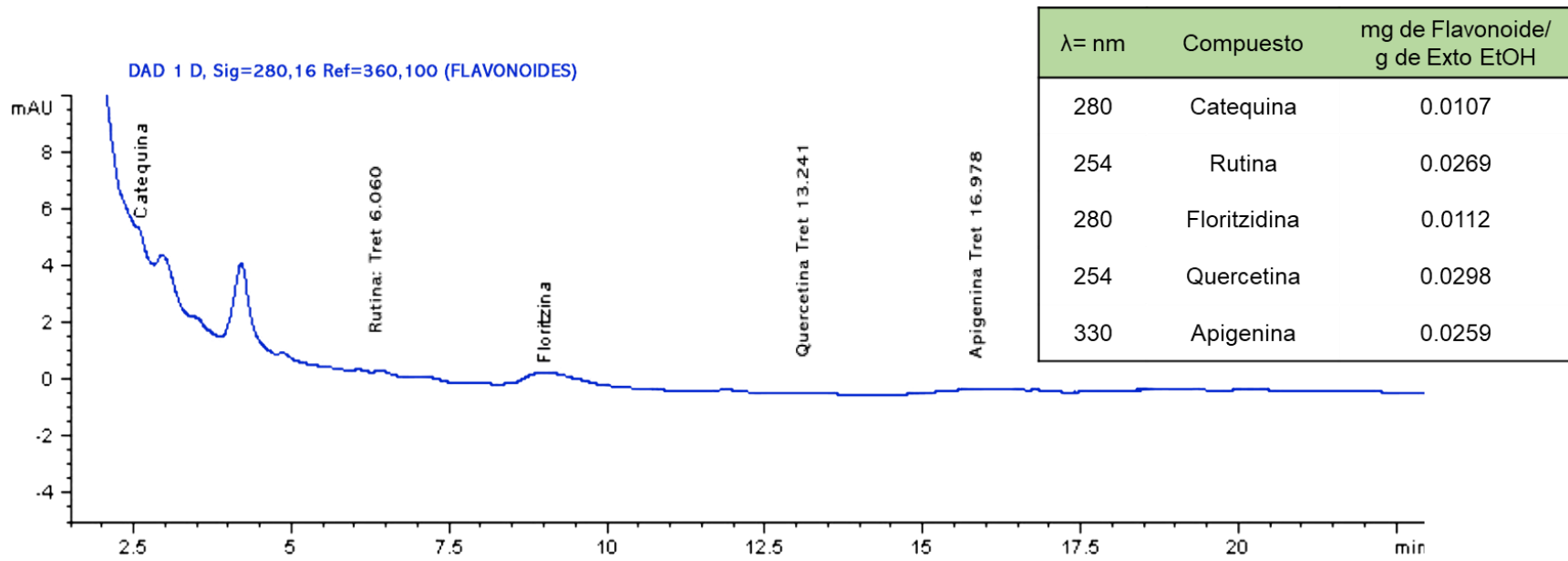
y activador de la transcripción). Tanto STAT1 como STAT2 son dos de los principales mediadores de IFN (interferón) mientras que STAT3 es el encargado de modular citocinas proinflamatorias como IL-6 o antiinflamatorias (IL-10) (Pfitzner, Kliem, Baus & Litterst, 2004).

El flavonoide catequina es capaz de reducir el edema plantar inducido por carragenina después de 60 y 120 minutos (Nardi *et al.*, 2003). En otro estudio, la fracción butanólica de *Abarena cochilacarpos* y su principal flavonoide, la catequina inhibieron significativamente la producción de NO y la expresión de COX-2 e iNOS; además de inhibir la cascada MAPK, por la regulación negativa en la activación de las quinasas JNK y p38. Entre los mediadores proinflamatorios que inhibe la catequina se encuentran IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12 y también la expresión de citocinas antiinflamatorias como IL-4 e IL-10 (Cheng *et al.*, 2019).

De los flavonoides detectados en el Exto Hx, solo se ha reportado en la literatura, la presencia de naringenina en *P. eryngii* y *P. ostreatus* (Alam *et al.*, 2010; Gąsecka *et al.*, 2015); mientras que para el Exto EtOH, se ha detectado la presencia de catequina y quercetina en *L. edodes* (Ávila-Castañeda, 2009; Kim *et al.*, 2008).



**Figura 14.** Cromatograma HPLC-Flavonoides en el Exto Hx de la cepa fúngica híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>.



**Figura 15.** Cromatograma HPLC-Flavonoides en el Exto EtOH de la cepa fúngica híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>.

### VIII.2.2.3 Terpenoides

En la Figura 16 se muestra el cromatograma obtenido por el HPLC al analizar el Exto Hx. Los terpenoides identificados fueron carnosol (0.5110 mg de terpenoide/g de Exto Hx), ácido ursólico (263.4216 mg de terpenoide/g de Exto Hx), estigmasterol (29.1684 mg de terpenoide/g de Exto Hx), ácido oleanólico (82.4612 mg de terpenoide/g de Exto Hx) y  $\beta$ -sitosterol (11.0069 mg de terpenoide/g de Exto Hx). Se observa, que los terpenoides encontrados en mayor cantidad fueron el ácido ursólico, el ácido oleanólico y estigmasterol. Mientras que en el extracto EtOH (Figura 17) se identificaron los terpenoides carnosol (0.0898 mg de terpenoide/g de Exto EtOH), ácido ursólico (2.9048 mg de terpenoide/g de Exto EtOH), estigmasterol (0.5517 mg de terpenoide/g de Exto EtOH), ácido oleanólico (45.0163 mg de terpenoide/g de Exto EtOH),  $\alpha$  amirina (7.0477 mg de terpenoide/g de Exto EtOH) y  $\beta$ -sitosterol (1.2318 mg de terpenoide/g de Exto EtOH). En este extracto los terpenoides encontrados en mayor cantidad fueron ácido oleanólico,  $\alpha$ -amirina y ácido ursólico.

Se ha reportado que, tanto la  $\alpha$ -amirina como la  $\beta$ -amirina, presentes en hojas, flores y frutos de diversas plantas son fuertes agentes antiinflamatorios. A través de cromatografías en columna, en capa delgada y preparativa la separación de un extracto en éter de hojas de *Bejaria resinosa* permitió obtener una mezcla de compuestos tipo triterpeno compuesta por germanicol,  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina. La mezcla de estos triterpenos redujo 68.8% el edema causado por TPA en la oreja del ratón (Matulevich, Gil & Ospina, 2016). De igual manera, en un modelo de pancreatitis aguda inducida por L-arginina en ratas, se observó que el tratamiento con  $\alpha$  y  $\beta$ -amirina (10, 30 y 100 mg/kg) disminuyó los niveles aumentados de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  en todas las dosis; sin embargo, la inhibición de IL-6 sólo fue significativa con 30 y 100 mg/kg. Los autores concluyeron que  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina, mejoran la pancreatitis aguda inducida con L-arginina en ratas (Melo *et al.*, 2010).

En el modelo murino de trasplante de células de los islotes (posible opción terapéutica para pacientes con diabetes mellitus tipo 1), se demostró que el ácido oleanólico prolongó la función de los islotes y aumentó los niveles de IL-10 sérica (2 veces) así como, el factor de crecimiento angiogénico VEGF (factor de crecimiento endotelial

vascular). En contraste, el tratamiento con ácido oleanólico disminuyó los niveles de IP-10 e IL-4 y también redujo la población de células T productoras de IFN $\gamma$  y de las interleucinas IL-4, IL-2 e IL-17 (Nataraju *et al.*, 2009). El tratamiento con ácido oleanólico ha mostrado efectos inhibitorios sobre el edema plantar inducido por carragenina, (58 % en una dosis de 300 mg/kg) además de reducir el volumen de exudado y la migración leucocitaria hacia la cavidad pleural inducido por carragenina (Singh *et al.*, 1992). El ácido oleanólico ha sido uno de los triterpenos más estudiados en inflamación y estrés oxidativo. Usando el modelo *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón estimulados con ionóforo de calcio y plaquetas humanas se observó que este compuesto es un inhibidor eficaz de la ciclooxigenasa (COX) y de la 5-lipoxigenasa (5-LOX) (Díaz *et al.*, 2000).

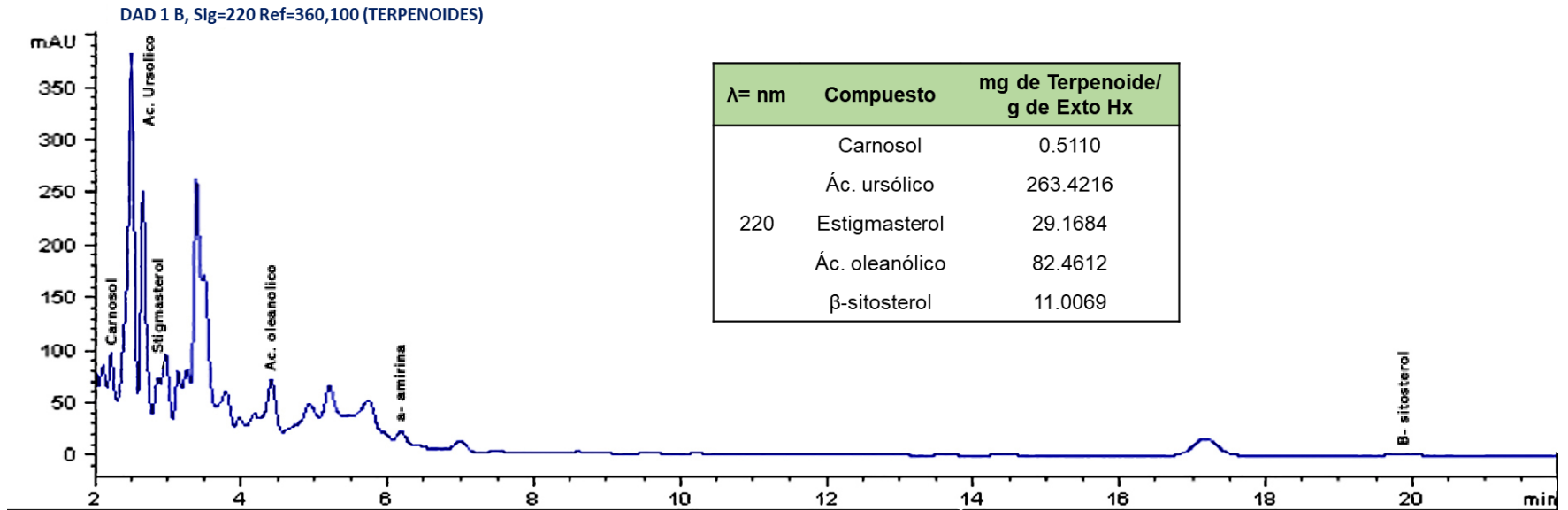
Respecto al ácido ursólico, compuesto terpénico encontrado tanto en el Exto Hx como en el EtOH de la cepa híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>, se ha reportado lo siguiente. Utilizando tres sistemas estándar diferentes, ácido ascórbico, tetracloruro de carbono y ADP/hierro, para inducir la peroxidación lipídica en microsomas aislados de hígado de rata *in vitro*, se estudió el efecto protector del ácido ursólico aislado de *Ocimum sanctum* y el ácido oleanólico de *Eugenia jumbolana* contra el daño inducido por los radicales libres. Tanto el ácido oleanólico como el ácido ursólico ofrecieron una protección notable del 90% y 60% respectivamente (Balanehru & Nagarajan, 1991). En otro estudio, linfocitos tratados con ácido ursólico 30 minutos antes de la exposición a luz UVB (280-230nm), presentaron una disminución progresiva en el porcentaje de peroxidación lipídica inducida por UVB (Ramachandran & Rajendra, 2008). En un modelo *in vivo*, el ácido ursólico ha demostrado actuar como agente antiinflamatorio, al inhibir en un 84% la inflamación en un modelo de edema auricular inducido por aceite de crotón (Baricevic *et al.*, 2011). El efecto antiinflamatorio del ácido ursólico se ha atribuido a la inhibición de vías implicadas en la inflamación como la vía de la ciclooxigenasa, la 5-lipooxigenasa y elastasa (Najid *et al.*, 1992); a la inhibición de la activación de MAPK, NF-kB y la secreción de citocinas (IL-1 $\beta$  e IL-6) inducidas por LPS (Checker *et al.*, 2012); así como a la reducción de ARNm de TNF- $\alpha$  y los niveles de COX-2, iNOS y NO (Zerin *et al.*, 2019).

El  $\beta$ -sitosterol es otro compuesto al que se le ha demostrado actividad antiinflamatoria. Con el modelo *in vitro* de inflamación inducida por carragenina en ratones, se encontró que este fitoesterol en dosis de 1 y 2 mg/kg, inhibió la actividad mieloperoxidasa y adenosina desaminasa, enzimas implicadas en la inflamación y los niveles de IL-1 $\beta$  y de TNF- $\alpha$  (Liz *et al.*, 2013). También se reportó que el tratamiento con  $\beta$ -sitosterol redujo la expresión de mediadores inflamatorios inducida por LPS: interleucina-6 (IL-6), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y ciclooxygenasa-2. (COX-2). Respecto a la vía de señalización, el tratamiento con este terpenoide puede inhibir la activación inducida por LPS de las vías p38, ERK y NF- $\kappa$ B (Sun, Gao, Hou & Wu, 2020). Por otro lado, modelos *in vivo* mostraron que  $\beta$ -sitosterol (5, 10 y 20 mg/kg, i.p.), asilado de *Nyctanthes arboristis*, redujo de manera dosis dependiente, el edema plantar inducido por carragenina y el efecto fue comparable al del fármaco de referencia ibuprofeno (50 mg/kg, i.p.) (Nirmal *et al.*, 2011). Otro estudio más reciente, fue el realizado por Paniagua-Pérez *et al.* (2017), en el cual, el  $\beta$ -sitosterol, presentó un importante potencial antiinflamatorio sobre el modelo de edema auricular inducido por TPA, al inhibir en un 75% la inflamación.

Respecto al carnosol, Arraz *et al.* (2014) informaron la actividad antiinflamatoria *in vitro* de dos extractos de romero activando macrófagos THP-1 utilizando lipopolisacárido humano ox-LDL. Los dos extractos presentaron alta actividad antiinflamatoria, pero el extracto enriquecido con ácido carnósico y carnosol (Extracto B) la presentó en mayor medida. De hecho, la actividad antiinflamatoria de los estándares de ácido carnósico y carnosol no fue tan intensa como la obtenida con el Extracto B. El Extracto B de romero inhibió la secreción de TNF- $\alpha$ , interleucina-1  $\beta$ , IL-6 y también disminuyó la secreción de IL-10, una citocina antiinflamatoria. En el estudio realizado por Maione *et al.* (2016), determinaron de manera más directa, el efecto antiinflamatorio del carnosol sobre la hiperalgesia de ratón inducida por carragenina, y reportaron que dicho metabolito inhibió la vía 5-lipooxigenasa y los derivados de ésta. Investigaciones más recientes han demostrado que el pretratamiento con carnosol, reduce la expresión genética de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y COX-2 inducidos por LPS (Baradaran *et al.*, 2022).

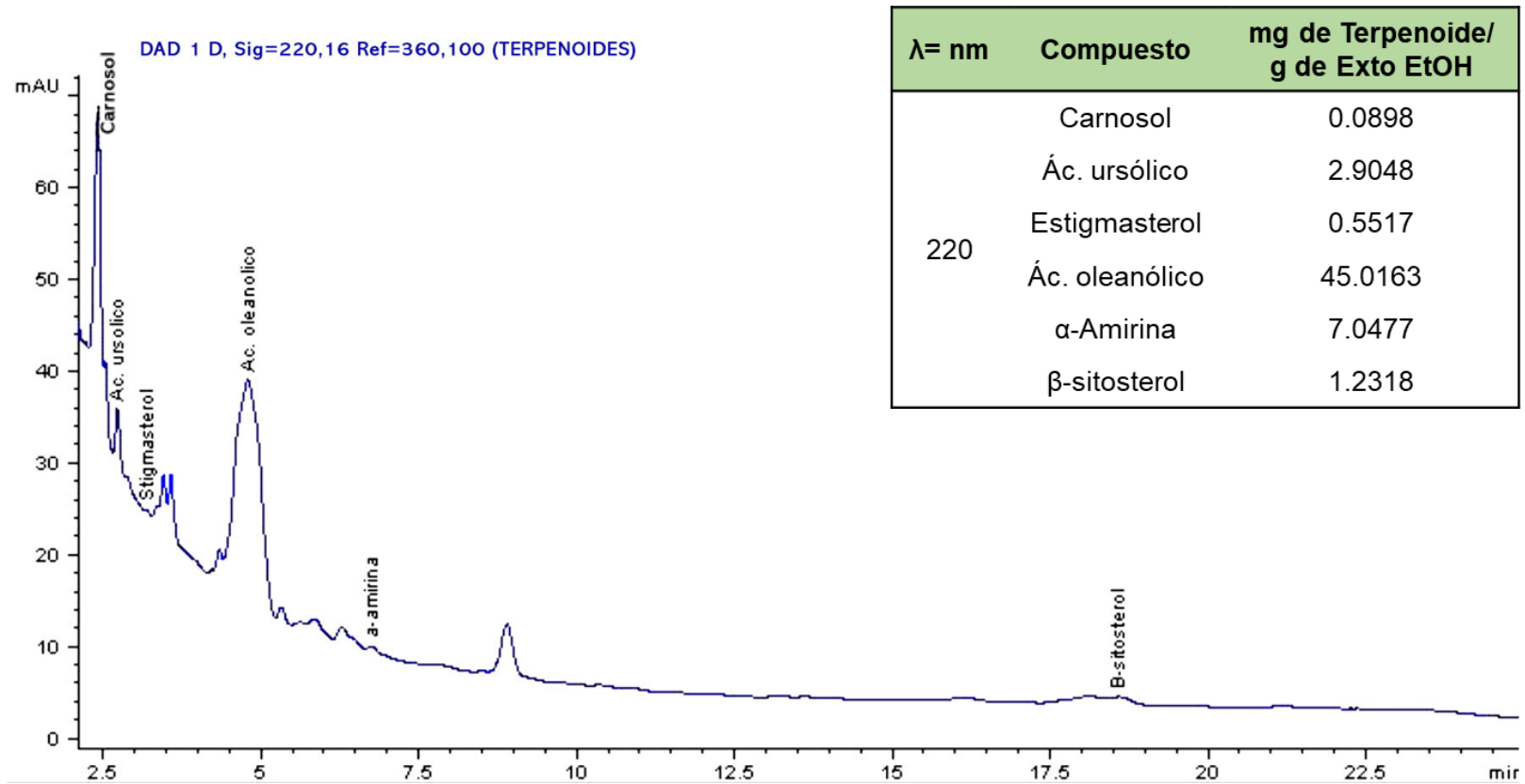
Referente al estigmasterol, se ha señalado que este terpenoide actúa como agente antiinflamatorio empleando modelos *in vivo*. En el estudio realizado por Ahmad *et al.* (2020) se evaluó el efecto antiinflamatorio del estigmasterol en el tratamiento de artritis reumatoide en ratas; los autores indicaron que el estigmasterol disminuyó el índice artrítico y el grosor de la almohadilla plantar, dos de los marcadores sintomáticos en la artritis reumatoide. Esta respuesta antiinflamatoria la atribuyeron a la supresión de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , iNOS y COX-2, así como al aumento en la expresión de citocinas antiinflamatorias (IL-10). En otro estudio, con el modelo de edema plantar inducido por ácido araquidónico en ratones, también se evaluó el efecto antiinflamatorio del estigmasterol. Los autores reportaron que dicho fitosterol inhibió un 50% del edema, 1.5 h después de su aplicación intraplantar (Morgan *et al.*, 2021).

Hasta el momento de la revisión, en la literatura no se encontraron estudios encaminados a detectar terpenoides en extractos de *L. edodes* ni en especies del género *Pleurotus*.



**Figura 16.** Cromatograma HPLC-Terpenoides en el Exto Hx de la cepa fúngica híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>.





**Figura 17.** Cromatograma HPLC-Terpenoides en el Exto EtOH de la cepa fúngica híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>.

Si bien la hibridación ha permitido la mejora de aspectos comerciales en la producción de hongos, este estudio evidenció que la cepa híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub> producida a partir de *Pleurotus djamor* y *Lentinula edodes*, conservó las propiedades antiinflamatorias de las parentales que le dieron origen.

Este es el primer reporte sobre la actividad antiinflamatoria *in vivo* de la cepa fúngica híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub> y los resultados se suman a las escasas investigaciones que con cepas híbridas se han realizado como la de Oropeza-Guerrero (2017) quien evaluó la capacidad antioxidante de cepas reconstituidas e híbridas a partir de cepas silvestres de *P. djamor* var. *djamor* y *P. djamor* var. *roseus*; así como la realizada por Valencia del Toro *et al.* (2012), donde se estimó la actividad antibacteriana de cepas híbridas de *Pleurotus* spp. En ambos estudios *in vitro* se registró una mejora de la actividad biológica en las cepas híbridas respecto a sus parentales.

El modelo de edema auricular inducido con TPA empleado para la evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vivo* de la cepa híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub> está relacionado con el metabolismo del ácido araquidónico. Se ha señalado que el agente irritante TPA actúa a través de la proteincinasa C (PKC), enzima que será activada por el diacilglicerol. En la membrana celular el TPA puede actuar como sustituto del diacilglicerol, activando a la PKC, con lo cual se desencadenan procesos como la liberación del ácido araquidónico y de sus metabolitos, así como la síntesis de moléculas proinflamatorias como IL-1 $\alpha$  y TNF- $\alpha$  (Calou *et al.*, 2008; De Young, 1989; Patil *et al.*, 2019).

En este estudio, a través del análisis por HPLC de los Exto Hx y EtOH de la cepa híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>, se identificaron compuestos bioactivos entre los que se encuentran ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides, que de acuerdo con la literatura algunos de ellos son capaces inhibir la producción de metabolitos del ácido araquidónico como las prostaglandinas, así como la expresión de vías como la ciclooxigenasa y la 5-lipooxigenasa (Díaz *et al.*, 2000; Najid *et al.*, 1992).

La presente investigación puso de manifiesto que tanto la composición como la cantidad de cada uno de los metabolitos detectados en los extractos Hx y EtOH de la cepa híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>; así como su efecto sinérgico, influyen directamente sobre la actividad antiinflamatoria de los mismos.

Es importante hacer notar que con excepción de alfa-amirina, terpenoide que sólo se encontró en el Exto EtOH, en ambos extractos se detectaron los terpenoides ácido ursólico, ácido oleanólico y estigmasterol y que el contenido de éstos fue mayor en el Exto Hx que en el Exto EtOH. Estos resultados ponen de manifiesto el papel que juega la polaridad del disolvente para la extracción en cantidad y calidad de los compuestos presentes en una muestra, que sin duda influyen en su actividad biológica.

Evidencia de ello es el estudio de Elgorashi *et al.*, 2008 quienes determinaron la actividad antiinflamatoria *in vitro* de extractos de micelio de 20 basidiomicetos superiores entre los que se encontraban *P. eryngii* y *P. salmoneostramineus*. Los autores reportaron que los extractos obtenidos con etanol al 70% (disolvente con alta polaridad) mostraron una menor actividad inhibidora contra ambas enzimas ciclooxigenasa-1 y -2. (COX-1 y COX-2) en comparación con los extractos de acetato de etilo (medianamente polar).

Con base en lo anterior, se puede sugerir que la mayor cantidad de terpenoides del Exto Hx en comparación con el Exto EtOH, es responsable de la mayor reducción del edema producida con el Exto Hx.

Á partir de este trabajo de investigación se abren nuevas líneas de investigación. Por un lado, aquellas destinadas a evaluar las propiedades medicinales que presentan las cepas fúngicas híbridas; en este caso específico, la actividad antiinflamatoria aguda/crónica de los híbridos interespecie o intergénero tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*. Y por el otro, investigaciones tendientes a establecer los mecanismos bioquímicos que subyacen a las actividades terapéuticas que exhiben los extractos o compuestos aislados de las cepas fúngicas híbridas.

## IX. CONCLUSIONES

- La cepa fúngica híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub> conserva la actividad antiinflamatoria reportada en la literatura para sus parentales *Pleurotus djamor* y *Lentinula edodes*.
- Los extractos Hx y EtOH de PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub> redujeron el edema auricular producido por el TPA y fue la dosis más baja (125 µg/10 µL) del Exto Hx la que redujo 76% el edema, valor más cercano a la inhibición producida por el fármaco de referencia Indometacina (84.60%).
- El análisis por HPLC detectó en el Exto Hx los ácidos fenólicos: ácido vainillínico, ácido ferúlico, ácido gálico; mientras que en el Exto EtOH solo se encontró el ácido β-resorcílico.
- Los flavonoides en el Exto Hx fueron galangina, naringenina y floritzidina y en el Exto EtOH quercetina, rutina, apigenina, floritzina y catequina.
- Tanto en el Exto Hx como en el EtOH, estuvieron presentes cinco terpenoides: ácido oleanólico, ácido ursólico, β-sitosterol, estigmasterol y carnosol; con excepción de α-amirina, terpenoide que solo se encontró en el Exto EtOH.
- El efecto antiinflamatorio observado con la cepa híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub> puede atribuirse a la presencia de los diferentes constituyentes identificados por HPLC en sus extractos.
- Este es el primer estudio *in vivo* que evidenció el efecto antiinflamatorio de la cepa fúngica híbrida PD<sub>4</sub> x LC<sub>3</sub>.

## LITERATURA CITADA

- Acharya, S. & Saha, A. K. (2011). Antimicrobial activity of *Pleurotus djamor*. *Journal of Mycopathological Research*, 49(2), 239-332.
- Adebayo, E., Oloke, J., Majolagbe, O., Ajani, R. & Bora, T. (2012). Antimicrobial and anti-inflammatory potential of polysaccharide from *Pleurotus pulmonarius* LAU 09. *Full Length Research Paper*, 6(13), 3315-3323.
- Ahmad, M., Golam, A., Rahat, R., Ahmed, R. & Umar, S. (2020). Stigmasterol protects rats from collagen induced arthritis by inhibiting proinflammatory cytokines. *International immunopharmacology*, 85(2020).
- Alam, N., Nam, K., Rim, K., Gyun, P., Chun, J., Bok, Y., Mi, J., Woong, M., Youn, U. & Soo, T. (2010). Antioxidant activities and tyrosinase inhibitory effects of different extracts from *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies. *Mycobiology*, 38(4), 295-301.
- AlphaChem. (2022). *Características, fases e inflamación crónica*. Disponible en: <https://alphachem.mx/index.php/es/pe-cyclosuprim-dac/item/489-inflamacion>
- Arraz, E., Jaime, L., García-Risco, M., Fornari, T., Reglero, G. & Santoyo, S. (2015). Anti-inflammatory activity of Rosemary extracts obtained by supercritical carbon dioxide enriched in carnosic acid and carnosol. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(3), 674-681.
- Avello, M. & Suwalski, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de producción. *Atenea*, 494, 161-172.
- Ávila-Castañeda, I.M. *Estudio de los compuestos polifenólicos, con énfasis en flavonoides, del hongo Lentinula edodes y determinación de la actividad antioxidante*. Tesis para optar por el título de Magister en Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Balanehru, S. & Nagarajan, B. (1991). Protective effect of oleanolic acid and ursolic acid against lipid peroxidation. *Biochemistry international*, 24(5), 981-990.
- Baradaran, V., Momeni-Moghaddam, M., Chini, M., Saviano, A., Maione, F., Bifulco, G., Rahmanian-Devin, P., Jebelbarezy, A. & Reza-Askari, V. (2022). Carnosol Attenuates LPS-Induced Inflammation of Cardiomyoblasts by Inhibiting NF-κβ: A Mechanistic *in Vitro* and *in Silico* Study. *Hindawi*, 22, 1-12.
- Baricevic, D., Sosa, S., Della-Loggia, R., Tubaro, A., Simonovska, B., Krasna, A., & Zupancic, A. (2001). Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 75(2001), 125-132.
- Barros de Oliveira, C., Kimiko, R., Machado, A., Gerola, L. & Salomao, R. (2011). Citocinas y Dolor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 61(2), 137-142.
- Bellik, Y., Boukraâ, L., Alzahrani, H., Bakhotmah, B., Abdellah, F., Hammoudi, S. & Iguer-Ouada, M. (2013). Molecular mechanism underlying anti-inflammatory and anti-allergic activities of phytochemicals: An Update. *Molecules*, 18(1), 322-353.
- Bisen, P., Baghel, R.K., Sanodiya, B.S., Thakur, G.S. & Prasad, G. (2010). *Lentinus edodes*: A Macrofungus with Pharmacological Activities. *Current Medical Chemistry*, 17(2010), 2419-2430.
- Cai, S.Q., Zhang, Q., Zhao, X.H. & Shi, J. (2021). The *in vitro* anti-inflammatory activities of Galangin and Quercetin towards the LPS-injured rat intestinal epithelial (IEC-6) cells as affected by heat treatment. *Molecules*, 26(24).

- Calixto-Campos, C., Carvalho, T. T., Hohmann, M. S. N., Pinho-Ribeiro, F. A., Fattori, V., Manchope, M. F. Verri, W. A. (2015). Vanillic Acid Inhibits Inflammatory Pain by Inhibiting Neutrophil Recruitment, Oxidative Stress, Cytokine Production, and NFκB Activation in Mice. *Journal of Natural Products*, 78(8), 1799–1808.
- Calou, I., Sousa, D., de Andrade Cunha, G., de Castro Brito, G., Rao, V. & Santos, F. (2008). Topically applied diterpenoids from *Egletes viscosa* (Asteraceae) attenuate the dermal inflammation in mouse ear induced by tetradecanoylphorbol 13-acetate-and oxazolone. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(8), 1511-1516.
- Campuzano, L. & Carpio, R. (2020). *Evaluación de la actividad antiinflamatoria in vivo del extracto acuoso del hongo Shiitake (Lentinula edodes) en ratones de experimentación*. Tesis para obtener el grado de Químico Farmacéutico. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.
- Cantú, S., Lee, H., Donoso, A., Puyó, A. & Peredo, H. (2017). El ácido araquidónico y sus derivados. Generalidades de los prostanoïdes en relación con procesos inflamatorios. *Ciencia e Investigación*, 67(4), 5-12.
- Chang S. T. & Miles, P. G. (2004). *Mushrooms Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect*. 2a ed CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Chang, S. (2005). Witnessing the development of the mushroom industry in China. *Acta Edulis Fungi*, 12.
- Checker, R., Sandur, S., Sharma, D., Patwardhan, R., Jayakumar, S., Kohlin, V., Sethi, G., Aggarwal, B. & Sainis, K. (2012). Potent Anti-Inflammatory Activity of Ursolic Acid, a Triterpenoid Antioxidant, Is Mediated through Suppression of NF-κB, AP-1 and NF-AT. *PLoS one*, 7(2), 1-15.
- Chandler, D., Woldu, A., Rahmadi, A., Shanmugam, K., Steiner, N., Wright, E., Benavente-García, O., Schulz, O., Castillo, J. & Münch, G. (2010). Effects of plant-derived polyphenols on TNF-α and nitric oxide production induced by advanced glycation endproducts. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54, 141-150.
- Cheng, A., Tan, X., Sun, J., Gu, C., Liu, C. & Guo, X. (2019). Catechin attenuates TNF-α induced inflammatory response via AMPK-SIRT1 pathway in 3T3-L1 adipocytes. *PLoS one*, 14(5), 1-15.
- Chung, T.W., Li, S., Lin, C.C. & Tsai, S.W. (2019). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the citrus flavanone naringenina. *Tzu Chi Medical Journal*, 31(2), 81-85.
- Clària, J., Ferré, N., González-Pérez, A., Horrillo, R. & López-Parra, M. (2007). Papel de los mediadores lipídicos derivados del ácido araquidónico en la inflamación y la fibrogénesis hepática. *Gastroenterología y Hepatología*, 30, 88-98.
- Claramunt, R. (2011). Guía de estudio 2011: Unidad temática III. Argentina: EDUNAM.
- CONICET. (2009). *El hongo Shiitake*. Disponible en: [https://bahiablanca.conicet.gov.ar/boletin/boletin29/indexe269.html?option=com\\_content&view=article&id=48&Itemid=62](https://bahiablanca.conicet.gov.ar/boletin/boletin29/indexe269.html?option=com_content&view=article&id=48&Itemid=62)
- Corrales, L. & Ariza, M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*, 10(18), 213-225.
- Das, A. R., Saha, A. K., Joshi, S. R., Das, P. (2017). Wild edible macrofungi consumed by ethnic tribes of Tripura in Northeast India with special reference to antibacterial activity of *Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn. *International Food Research Journal*, 24(2), 834-838.

- de Gaetano, G., & Collaborative Group of the Primary Prevention Project (2001). Low-dose aspirin and vitamin E in people at cardiovascular risk: a randomised trial in general practice. Collaborative Group of the Primary Prevention Project. *Lancet (London, England)*, 357(9250), 89-95. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(00\)03539-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)03539-x)
- de la Peña Fernández A. & Redondo Bellón, P. (1997). Radicales libres y mecanismos antioxidantes. Generalidades y aplicaciones a la práctica clínica. *Revista Clínica Española*, 197(6), 434-446.
- De Young, L., Kheifets, J., Ballaron, S. & Young, J. (1989). Edema and cell infiltration in the phorbol ester treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacology agents. *Agents actions*, 26(3-4).
- Díaz, A. M., Abad, M. J., Fernández, L., Recuero, C., Villaescusa, L., Silván, A. M., & Bermejo, P. (2000). In vitro anti-inflammatory activity of iridoids and triterpenoid compounds isolated from *Phillyrea latifolia* L. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 23(11), 1307-1313. <https://doi.org/10.1248/bpb.23.1307>
- Divins, M. J. (2014). Antiinflamatorios. *Farmacia Profesional*, 28(5), 19-22.
- Echeverry, M. (1992). Inflamación II: mediadores químicos. *Revista de Estomatología*, 2(1), 29-33.
- Elgorashi, E. E., Maekawa, N., & Satoh, H. (2008). In vitro anti-inflammatory activity of selected Japanese higher Basidiomycetes mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 10 (1).
- Elsayed, E. A., El Enshasy, H., Wadaan, M. A., & Aziz, R. (2014). Mushrooms: a potential natural source of anti-inflammatory compounds for medical applications. *Mediators of inflammation*, 2014, 805841. <https://doi.org/10.1155/2014/805841>
- Enciso, E. & Arroyo, J. (2011). Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Jungia rugosa* Less (matico de puna) en un modelo experimental en ratas. *Anales de la Facultad de Medicina*, 72(4), 231-237.
- Endriger, D., Pezzuto, J. & Braga, F. (2009). NF-kB inhibitory activity of cyclitols isolated from *Hancornia speciosa*. *Science Direct*, 16(2009), 1064-1069.
- Escribano-Ferrer, E., Queralto-Regué, J., García-Sala, X., Boix, A. & Lamuela-Raventos, R. (2018). In vivo Anti-inflammatory and Antiallergic Activity of Pure Naringenin, Naringenin Chalcone and Quercetin in Mice. *Journal Natural Products*, 82(2), 117-182.
- Fagali, N.S. (2011). *Peroxidación de diferentes especies lipídicas: efecto de antioxidantes*. Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata, Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas.
- Fardet, L. & Feve, B. (2014). Systemic Glucocorticoid Therapy: a Review of its Metabolic and Cardiovascular Adverse Events. *Drugs*, 74, 1731-1745.
- Franco, L., Matiz, G., Calle, J., Pinzón, R. & Ospina, L. (2007). Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones obtenidas de cálices de *Physalis peruviana* L. *Biomédica*, 27(1), 110-115.
- Franco-Ospina, L., Castro-Guerrero, J., Ocampo-Buendía, Y., Pájaro, I. & Díaz, F. (2013). Actividad antiinflamatoria, antioxidante y antibacteriana de dos especies del género *Tabebuia*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(1).
- Gaitán-Hernández, R. (2000). Obtención de cepas de *Neolentinus suffrutescens* por entrecruzamiento, su caracterización *in vitro* y producción de cuerpos fructíferos a nivel de planta piloto. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17, 20-24.

- Gaitán-Hernández, R., Esqueda, M., Gutiérrez, A., Sánchez, A., Beltrán-García, M. & Mata, G. (2006). Bioconversion of agrowastes by *Lentinula edodes*: the high potencial of viticulture residues. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(2006), 432-439.
- González, M., Ospina, G. & Rincón J. (2011). Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones de *Myrcianthes leucoxila*, *Calea prunifolia*, *Curatella americana* y *Physalis peruviana* en los modelos de edema auricular por TPA, edema plantar por carragenina y artritis inducida por colágeno. *Biosalud*, 10(5), 9-18.
- González-Morales, A., Ribas-Aparicio, R. & Burrola-Aguilar, C. (2022). Actividad antioxidante de hongos silvestres consumidos tradicionalmente en el centro de México. *Scientia fungorum*, 52, 1-10.
- Gąsecka, M., Mleczek, M., Siwulski, M. & Niedzielski, P. (2016). Phenolic Composition and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* enriched with selenium and zinc. *Eur Food Res Technol*, 242, 723-732.
- Gregori, A., Švagelj, M., & Pohleven, J. (2007). Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food Technology and Biotechnology*, 45 (3), 238-249.
- Guadarrama-Mendoza, P. (2013). *Productividad y caracterización de cepas parentales e híbridas provenientes de neohaplontes compatibles de Pleurotus spp. de la región mixteca*. Tesis para obtener el título de Doctora en Ciencias en Bioprocesos, Unidad profesional interdisciplinaria de biotecnología, Instituto Politécnico Nacional, México.
- Guardia, T., Rotelli, A. E., Juarez, A. O., & Pelzer, L. E. (2001). Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmaco (Societa chimica italiana: 1989)*, 56(9), 683-687. [https://doi.org/10.1016/s0014-827x\(01\)01111-9](https://doi.org/10.1016/s0014-827x(01)01111-9)
- Guo, H., Callaway, J. B. & Ting, J. (2015). Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature medicine*, 21(7), 677-687.
- Gutiérrez-Saldaña, A. H. (2005). *Efecto de la composición química del sustrato sobre la producción de Lentinula edodes*. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora.
- Gutiérrez H. (2012). *Evaluación de residuo de papel y sus mezclas con paja de trigo para el cultivo de Pleurotus djamor var. roseus*. Tesis para obtener el grado de licenciado, UAEM.
- Gutiérrez-Restrepo, J. (2021). Efectos adversos de la terapia con Glucocorticoides. *Iatreia*, 34(2), 137-150.
- Guzmán, G. (2003). Los hongos del Edén de Quintana Roo: Introducción a la microbiota tropical de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Instituto de Ecología, A. C. Xalapa, Veracruz.
- Guzmán, M., Zuñiga, N., Santafé, G., Torres, O. & Angulo, A. (2009). Actividad antioxidante y estudio químico del hongo *Pleurotus djamor* recolectado en Córdoba. *Bioteología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, 7(2), 63-69.
- Hansson, L., Zanchetti, A., Carruthers, S. G., Dahlöf, B., Elmfeldt, D., Julius, S., Ménard, J., Rahn, K. H., Wedel, H., & Westerling, S. (1998). Effects of intensive blood-pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomised trial. HOT Study Group. *Lancet (London, England)*, 351(9118), 1755-1762. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(98\)04311-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(98)04311-6)
- Hifas da terra (a). *Pleurotus ostreatus: Seta de ostra*. Disponible en: <https://hifasdaterra.com/hongos-medicinale/s/pleurotus-ostreatus-seta-ostra/>



- Hifas da terra (b). *Lentinula edodes*: Shiitake. Disponible en: <https://hifasdaterra.com/hongos-medicinales/shiitake-lentinula-edodes/>
- Hoesel, B. & Schmid, J. (2013). The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer*, 12(86).
- Hwang, S., Weckslar, A., Wagner, K. & Hammock, B. (2013). Rationally designed multitarget agents against inflammation and pain. *Current Medicinal Chemistry*, 20(13), 1783–1799.
- Im, K., Nguyen, T., Shin, D., Lee, K., & Lee, T. (2014). Appraisal of Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Various Extracts from the Fruiting Bodies of *Pleurotus florida*. *Molecules*, 19(3), 3310-3326.
- Jose, N., Ajith, T. A., & Janardhanan, K. K. (2002). Antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor activities of culinary-medicinal mushroom *Pleurotus pufmonanus* (Fr.) Quel. (Agaricomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 4 (4).
- Jose, N., Ajith, T. A., & Janardhanan, K. K. (2004). Methanol extract of the oyster mushroom, *Pleurotus florida*, inhibits inflammation and platelet aggregation. *Phytotherapy Research: PTR*, 18(1), 43-46. <https://doi.org/10.1002/ptr.1355>.
- Joseph, S. V., Edirisinghe, I., & Burton-Freeman, B. M. (2016). Fruit Polyphenols: A Review of Anti-inflammatory Effects in Humans. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(3), 419-444. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.767221>
- Juárez-Pacheco, L. (2013). *Estudio químico de una cepa comercial del hongo Pleurotus sp.* Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo, Facultad de Química Farmacéutica Biológica, Universidad Veracruzana, Veracruz, México.
- Jung, Y., Kim, M., Yoon, J., Park, P., Youn, H., Lee, H. & Lee, J. (2014). Anti-inflammatory effects of galangin on lipopolysaccharide-activated macrophages via ERK and NF-κB pathway regulation. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 36(6), 426-432.
- Karki, R., Park, C. & Kim, D. (2013). Extracts of buckwheat sprouts scavenges oxidation and inhibits pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated macrophages (RAW264.7). *Journal of Integrative Medicine*, 11(4), 246-252.
- Khaund, P. & Joshi, S. R. (2016). *Lentinula edodes* based GIS mapping, biometabolites and antiinflammatory activity of wild edible mushrooms from tropical “sacred grove” forest of Meghalaya, India. *Revista de Biología Tropical*, 64(1), 263-273.
- Kim, G. Y., Park, H. Y. & Choi, Y. H. (2012). Naringenin attenuates the release of pro-inflammatory mediators from lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia by inactivating nuclear factor-κB and inhibiting mitogen-activated protein kinases. *International journal of molecular medicine*, 30(1), 204-210.
- Kim, H., & Song, M. J. (2014). Analysis of traditional knowledge for wild edible mushrooms consumed by residents living in Jirisan National Park (Korea). *Journal of ethnopharmacology*, 153 (1), 90-97.
- Kim, M., Seguin, P., Ahn, J., Kim, J., Chun, S., Kim, E., Seo, S., Kang, E., Kim, S., Park, Y., Ro, H. & Chung, I. (2008). Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 7265-7270.
- Kim, S., Jun, C., Suk, K., Choi, B.J., Lim, H., Park, S., Lee, S., Shin, H., Kim, D. & Shin, T. (2006). Gallic Acid Inhibits Histamine Release and Pro-inflammatory Cytokine Production in Mast Cells. *Toxicological Sciences*, 91(1), 123-131.

- Know, K., Murakami, A., Tanaka, T. & Ohigashi, H. (2005). Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochemical Pharmacology*, 69(2005), 395-406.
- Ko, H. H., Hung, C. F., Wang, J. P., & Lin, C. N. (2008). Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. *Phytochemistry*, 69(1), 234–239.
- Kroes, B.H., van den Berg, A., Quarles van Ufford, H.C., van Dijk, H. & Labadie, R.P. (1991). Anti-Inflammatory Activity of Gallic Acid. *Planta Medica*, 58(6), 499-504.
- Letterio, J. J., & Roberts, A. B. (1997). TGF- $\beta$ : A Critical Modulator of Immune Cell Function. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 84(3), 244-250.
- Lezama, P. (2006). Rol de quimiocinas y sus receptores en la inflamación. *Revista Médica Vallejiana* 3(2), 133-139.
- Liang, Y., Huang, Y., Tsai, S.H., Lin-Shiau, S.Y., Chen, C.F. & Lin, J.K. (1999). Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, 20(10), 1945-1952.
- Liu, Y., Shi, L., Qiu, W. & Shi, Y. (2022). Ferulic acid exhibits anti-inflammatory effects by inducing autophagy and blocking NLRP3 inflammasome activation. *Molecular & cellular toxicology*, 18(4), 509-519.
- Liz, R., Zanatta, L., Oliveira, G., Horst, H., Pizzolatti, M., Mena, F. & Frode, T. (2012). Acute effect of b-sitosterol on calcium uptake mediates anti-inflammatory effect in murine activated neutrophils. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(1), 115-122.
- Lu, H., Yao, H., Zou, R., Chen, X. & Xu, H. (2019). Galangin Suppresses Renal Inflammation via the Inhibition of NF- $\beta$ B, PI3K/AKT and NLRP3 in Uric Acid Treated NRK-52E Tubular Epithelial Cells. *Hindawi*, 2019, 1-10.
- Maione, F., Cantone, V., Pace, S., Chini, M. G., Bisio, A., Romussi, G., ... Bifulco, G. (2016). Anti-inflammatory and analgesic activity of carnosol and carnosic acid *in vivo* and *in vitro* and *in silico* analysis of their target interactions. *British Journal of Pharmacology*, 174 (11), 1497–1508.
- Malgor, V. (2013). *Drogas tipo aspirina: Analgésicos, antipiréticos, y antiinflamatorios no esteroideos (AINE's)*. Disponible en: [https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/0000cap7\\_aines.pdf](https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/0000cap7_aines.pdf)
- Manjeet, K. R. & Ghosh, B. (1999). Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  production in murine macrophages. *International journal of immunopharmacology*, 21(7), 435-443.
- Mariaca, C., Zapata, M. & Uribe, P. (2016). Oxidación y antioxidantes: hechos y controversias. *Revista de la asociación de dermatología y cirugía dermatológica*, 24(3), 162-173.
- Marnys. (2020). *Shiitake, Reishi y Maitake, hongos para la salud*. Disponible en: <https://www.marnys.hn/blog/shiitake-reishi-maitake-hongos-para-salud>
- Martínez-Carrera, D., Morales, P., Sobal, M., Bonilla, M. & Martínez, W. (2006). México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles. Capítulo 6.1, 209-224 pp. In: El Cultivo de Setas *Pleurotus* spp. en México. J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata & H. Leal (Eds.). ECOSUR-CONACYT, México, D.F.
- Mata, G., Gaitán-Hernández, R. & Salmones, D. El cultivo del Shiitake: Tecnología e innovación en la producción de un alimento y medicina ancestral. Instituto de Ecología, A.C., Xalapa, México. 78 pp.

- Matulevich, J., Gil, E. & Ospina, L. (2016). Estudio fitoquímico y actividad antiinflamatoria de hojas, flores y frutos de *Bejaria resinosa* Mutis ex L. (pegamosco). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(3), 332-345.
- Mayo Clinic. (2020). *Prednisona y otros corticoides*. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es-es/steroids/art-20045692>
- Mejias-Delamano, A. (2010). *Glucocorticoides*. Disponible en: <https://anestesiario.org/WP/uploads/2012/11/glucocorticoides2010-13027501575066-phpapp02.pdf>
- Melo, C. M. (2010).  $\alpha,\beta$ -amyrin, a natural triterpenoid ameliorates L-arginine-induced acute pancreatitis in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 16(34), 4272.
- Merkle, J. C. (2011). Inflamación, reacción inflamatoria y fiebre. En Porth, M. C. (Ed.), *Fundamentos de Fisiopatología alteraciones de la salud. Conceptos básicos* (3ª Ed. pp.51-65), Barcelona: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.
- Miles, P. G. y J.R. Raper. 1956. Recovery of the component strains from dikaryotic mycelia. *Mycologia*, 48, 484-494.
- Min-Cheol, K., Kim, S. J., Kim, D. S., Jeon, Y. D., Park, S. J., Lee, H. S., Um, J. Y. & Hong, S. H. (2011). Vanillic acid inhibits inflammatory mediators by suppressing NF- $\kappa$ B in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 33(3), 525-532.
- Mishra, K. K., Pal, R. S., Arunkumar, R., Chandrashekar, C., Jain, S. K. & Bhatt, J. C. (2013). Antioxidant properties of different edible mushroom species and increased bioconversion efficiency of *Pleurotus eryngii* using locally available casing materials. *Food chemistry*, 138(2-3), 1557–1563.
- Mitchell, R. (2013). Inflamación y reparación. En V. Kummar, A. K. Abbas & J. C. Aster. (Eds). Robbins: *Patología humana* (pp. 29-73). Barcelona, España.
- Mora, V. M. & Martínez-Carrera, D. (2007). Investigaciones básicas, aplicadas y socioeconómicas sobre el cultivo de setas (*Pleurotus*) en México. Capítulo 1.1, pp. 7-26. In: El Cultivo de Setas *Pleurotus* spp. en México. J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata & H. Leal (Eds.). ECOSUR, México, D.F.
- Morgan, L. V., Petry, F., Scatolin, M., de Oliveira, P. V., Alves, B. O., Zilli, G. A. L. & Müller, L. G. (2021). Investigation of the anti-inflammatory effects of stigmasterol in mice: insight into its mechanism of action. *Behavioural pharmacology*, 32(8), 640-651.
- Mota, M., Thomas, G., & Barbosa, F. (1985). Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 13(3), 289-300.
- Muñoz-Bellido, F. (2021). Los corticoides. En J. M. Zubeldia, M. Baeza, T. Chivato, I. Jáuregui & C. Senet. (Eds). *El libro de las enfermedades alérgicas* (479-489).
- Murphy, H. (2012). Inflamación. En E. Rubín (Ed). *Patología: fundamentos clinicopatológicos en medicina* (pp. 47-82). Barcelona, España.
- Najid, A., Simon, A., Cook, J., Chable-Rabinovich, H., Delage, C., Chulia, A.J. & Rigaud, M. (1992). Characterization of ursolic acid as a lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitor using macrophages, platelets and differentiated HL60 leukemic cells. *FEBS*, 229(3), 213-217.
- Nardi, G. M., Felippi, R., DalBó, S., Siqueira-Junior, J. M., Arruda, D. C., Delle Monache, F. & Ribeiro-do-Valle, R. M. (2003). Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. *Phytomedicine*, 10(2-3), 176-184.

- Nataraju, A., Saini, D., Ramachandran, S., Benshoff, N., Liu, W., Chapman, W., & Mohanakumar, T. (2009). Oleanolic Acid, a plant triterpenoid, significantly improves survival and function of islet allograft. *Transplantation*, 88(8), 987.
- Nirmal, S. A., Pal, S. C., Mandal, S. C., & Patil, A. N. (2011). Analgesic and anti-inflammatory activity of  $\beta$ -sitosterol isolated from *Nyctanthes arbortristis* leaves. *Inflammopharmacology*, 20(4), 219–224.
- Nuñez-Cámara, C., Ventura-López, P. & Martínez-Escudero, J.A. (2001). AINE's "clásicos" e inhibidores selectivos de la COX-2. *Boletín farmacoterapéutico Castilla la Mancha*, 11(4).
- O'Leary, K. A., de Pascual-Tereasa, S., Needs, P. W., Bao, Y. P., O'Brien, N. M., & Williamson, G. (2004). Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 551(1-2), 245-254.
- Oropeza-Guerrero, M. P. (2017). *Productividad y actividad antioxidante de cepas silvestres, reconstituidas e híbridas de Pleurotus djamor*. Tesis para obtener el título de Maestra en Ciencias, Universidad tecnológica de la Mixteca, División de estudios de posgrado, Oaxaca, México.
- Paniagua-Pérez, R., Flores-Mondragón, G., Reyes-Legorreta, C., Herrera-López, B., Cervantes-Hernández, I., Madrigal-Santillán, O. & Madrigal-Bujaidar, E. (2016). Evaluation of the anti-inflammatory capacity of beta-sitosterol in rodent assays. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14(1), 123–130.
- Pannu, A., Goyal, R.K., Ojha, S. & Nandave, M. (2019). Naringenin: A promising flavonoid for herbal treatment of rheumatoid arthritis and associated inflammatory disorders. En R. Ross-Watson & V. Preedy (Eds). *Bioactive food as dietary interventions for arthritis and related inflammatory diseases* (pp. 343-354).
- Patil, K., Mahajan, U., Unger, B., Goyal, S., Belemkar, S., Surana, S., Ojha, S. & Patil, C. (2019). Animal models of inflammation for screening of anti-inflammatory drugs: implications for the discovery and development of phytopharmaceuticals. *Int. J. Mol. Sci.*, 5(18).
- Pensamiento, C. (2022). *Caracterización fisicoquímica, nutricional y funcional de flores con potencial en la alimentación y salud*. Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias de los alimentos y salud humana, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias de la Salud, Hidalgo, México.
- Pérez, A., López, A. & Grau, I. (2002). Antiinflamatorios no esteroideos (AINE's). Consideraciones para su uso estomatológico. *Revista Cubana de Estomatología*, 39(2).
- Pfitzner, E., Kliem, S., Baus, D., & Litterst, M. C. (2004). The role of STATs in inflammation and inflammatory diseases. *Current pharmaceutical design*, 10(23), 2839-2850.
- Pinho-Ribeiro, F. A., Hohmann, M. S., Borghi, S. M., Zarpelon, A. C., Guazelli, C. F., Manchope, M. F., Casagrande, R., & Verri, W. A., Jr (2015). Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mice: role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF- $\kappa$ B. *Chemico-Biological interactions*, 228, 88-99. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.01.011>
- Plaza-Pérez, J. (1983). Los corticosteroides en el trasplante renal. *Nefrología*, 3(1), 8-10.
- Prieto, M., Rivas, J. V., Novoa, J. L., & Pérez-Barriocanal, F. (2002). El TGF-beta: síntesis y mecanismo de acción. *Nefrología*, 22(2), 135-143.
- Ramachandran, S., & Prasad, N. R. (2008). Effect of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, on ultraviolet-B radiation-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and DNA damage in human lymphocytes. *Chemico-biological interactions*, 176(2-3), 99-107.

- Ramírez-Carrillo, R. (2011). *Mejoramiento genético de Lentinula*. Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias (Biología), Universidad Autónoma de México, México D.F, México.
- Ridker, P., Cook, N., Lee, I., Gordon, D., Gaziano, J., Manson, J., Hennekens, C. & Buring, J. (2005). A Randomized Trial of Low-Dose Aspirin in the Primary Prevention of Cardiovascular Disease in Women. *The New England Journal of Medicine*, 352(13), 1293- 1304.
- Rivera, O., Albarracín, W., Lares, M. (2017). Componentes Bioactivos del Shiitake (*Lentinula edodes* Berk. Pegler) y su impacto en la salud. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 36(3), 67-71.
- Ross, R. & Reske-Kunz, A. (2001). The role of NO in contact hypersensitivity. *International Immunopharmacology*, 1(8), 1469, 1478.
- Royse, D. J. (2001). Cultivation of Shiitake on natural and synthetic logs. Pen State College of Agricultural Science Agricultural Research and Cooperative Extension, Pennsylvania, USA.
- Royse, D. J. (2014, November). A global perspective on the high five: *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Auricularia* & *Flammulina*. In Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8) (Vol. 1, pp. 1-6).
- Ruibal-León, A., Fernández-Machín, L. & González-García, V. (2004). Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. *Revista Cubana de Medicina*, 43(4).
- Salmones, D., Valdéz, L. M., & Gaitán-Hernández, R. (2004). Entrecruzamiento y evaluación de la producción de las variedades de *Pleurotus djamor* (Fr.) Boedijn. *Scientia Fungorum*, (18), 21-26.
- Salmones, D. (2017). *Pleurotus djamor*, un hongo con potencial aplicación biotecnológica para el neotrópico. *Revista mexicana de micología*, 46, 73-85.
- Sebastián-Domingo J. J. (2002). Gastropatía por AINE. Efectos adversos. *Farmacia Profesional*, 16(7), 48-53.
- Sharma, V. P., Kamal, S., Upadhyay, R. C., Kumar, S., Sanyal, S. K., & Singh, M. (2015). Taxonomy, Phylogeny, Cultivation and Biological Activities of a *Lentinus* Species from Andaman & Nicobar Islands (India). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 570-576.
- Shi, Y., Chen, X., Qiang, S., Su, J., & Li, J. (2021). Anti-oxidation and anti-inflammatory potency evaluation of ferulic acid derivatives obtained through virtual screening. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21).
- Singer R., Harris B. 1987. Mushrooms and truffles: botany, cultivation and utilization. 2nd Ed. Koeltz Science Books, Koenigstein. pp. 30-98.
- Singh, G. B., Singh, S., Bani, S., Gupta, B. D., & Banerjee, S. K. (1992). Anti-inflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 44(5), 456-458.
- Smolinski, A. & Pestka, J. (2003). Modulation of lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine production *in vitro* and *in vivo* by the herbal constituents apigenin (chamomile) ginsenoside Rb1 (ginseng) and parthenolide (feverfew). *Food and Chemical Toxicology*, 41(10), 1381-1390.
- Sonnenberg, A. S. M., Baars, J. P., Hendrickx, P. M. & Kerrigan, R. W. (2005). Breeding mushroom: state of the art. En: Tal, M. T. (Ed). Fifth Conference on Mushroom Biology and Mushroom products. Acta Edulis Fungi. Xinhua Pronting Co. Ltd, Shangai, China. Volumen 12. Pp. 163-173.
- Sroka, Z. & Cisowski, W. (2003). Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 41(6), 753-758.

- Stavinoha W., Slama J., Weintraub S., & Mobley P. (1991). The Antiinflammatory activity of *Ganoderma lucidum*. Third International Symposium on *Ganoderma lucidum*. 9-21.
- Steering Committee of the Physicians Health Study Research Group. (1989). Final report on the aspirin component of the ongoing physicians health study. *The New England journal of medicine*, 321(3), 129-135.
- Suárez, R. & Buevas, N. (2015). El inflammasoma: mecanismos de activación. *Investigación clínica*, 56(1), 74-99.
- Sudha, G., Janardhanan, A., Moorthy, A., Chinnasamy, M., Gunasekaran, S., Thimmaraju, A. Gopalan, J. (2016). Comparative study on the antioxidant activity of methanolic and aqueous extracts from fruiting bodies of an edible mushroom *Pleurotus djamor*. *Food Science and Biotechnology*, 25(2), 371-377.
- Sun, Y., Gao, L., Hou, W., & Wu, J. (2020).  $\beta$ -Sitosterol Alleviates Inflammatory Response via Inhibiting the Activation of ERK/p38 and NF- $\kappa$ B Pathways in LPS-Exposed BV2 Cells. *BioMed Research International*, 2020, 1–10.
- The medical Research Council's General Practice Research Framework. (1998). Thrombosis prevention trial: randomised trial of low-intensity oral anticoagulation with warfarin and low 10 dose aspirin in the primary prevention of ischaemic heart disease in men at increased risk. *The Lancet*, 351, 233-241.
- Toledo-Yupanqui, C. (2014). Inflamación: mediadores químicos. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, 43.
- USDA: FoodData Central. *Mushrooms, shiitake*. Disponible en: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/1999628/nutrients>
- Valencia del Toro, G. & Garín-Aguilar, M.E. (2010). Manual de Practicas de Productos Naturales. México: Instituto Politécnico Nacional: Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología.
- Valencia del Toro, G., Garín-Aguilar, M., Cuadros, A., Aguilar, L. & Durán, E. (2012). Actividad antibacteriana de extractos de cepas híbridas y parentales de *Pleurotus* spp. En. J. Sánchez & G. Mata. (Eds.), *Hongos comestibles en Iberoamérica: investigación y desarrollo en un entorno multicultural* (pp. 319-328).
- Valenzuela-Cobos, J. D. 2018. *Evaluación morfológica, nutricional y de productividad de cepas híbridas de PleurotusxLentinula*. Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias en Bioprocesos, Instituto Politécnico Nacional, México D.F.
- Vega-Robledo, G. (2008). Inflamación. Medigraphic: *Artemisa*, 51(5), 220-222.
- Wen, C. L., Chang, C. C., Huang, S. S., Kuo, C. L., Hsu, S. L., Deng, J. S., & Huang, G. J. (2011). Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Antrodia cinnamomea* mycelia both *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), 575-584.
- Yang, Y., Kim, S. C., Yu, T., Yi, Y. S., Rhee, M. H., Sung, G. H. & Cho, J. Y. (2014). Functional Roles of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Macrophage-Mediated Inflammatory Responses. *Mediators of Inflammation*, 2014, 1-13.
- Yoon, C. H., Chung, S. J., Lee, S. W., Park, Y. B., Lee, S. K., & Park, M. C. (2013). Gallic acid, a natural polyphenolic acid, induces apoptosis and inhibits proinflammatory gene expressions in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Joint Bone Spine*, 80(3), 274-279.

- Young, J. M., Wagner, B. M., Spires, D. A. (1983). Tachyphylaxis in 12-0-tetradecanoylphorbol acetate-and arachidonic acid-induced ear edema. *J Invest Dermatol*, 80(1), 48-52.
- Zeb, A. (2020). Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *Journal of Food Biochemistry*.
- Zerin, T., Lee, M., Jang, W. S., Nam, K. W., & Song, H. Y. (2016). Anti-inflammatory potential of ursolic acid in Mycobacterium tuberculosis-sensitized and Concanavalin A-stimulated cells. *Molecular Medicine Reports*, 13(3), 2736–2744.